Einführung
in die
botanische Mikrotechnik

Von

Hubert Sieben
Techniker am Botanischen Institut der Universität Bonn

Mit 19 Textabbildungen

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1913

Weimar. — Druck von R. Wagner Sohn.

Inhaltsverzeichnis.

Zur Einführung.

Seit langem ist die Mikrotom- und Färbetechnik so sehr Gemeingut auch der botanischen Forschung geworden, daß man sich nicht mehr die Frage vorlegt, wer sie denn eigentlich für die Botanik zurechtgemacht und zu ihrer gegenwärtigen Vollkommenheit ausgearbeitet hat. Die führende Rolle des botanischen Institutes in Bonn, dessen Leitung jetzt in meine Hände gelegt ist, und seines langjährigen, auf dem Gebiete der Pflanzencytologie bahnbrechenden Leiters in der Entwicklung der Untersuchungstechnik ist zwar allbekannt. Daß aber Strasburgers „rechte Hand" in allen technischen Dingen sein treuer Diener und Techniker Sieben gewesen ist, und daß weitaus die meisten der technischen Kunstgriffe, deren Kenntnis die sonst so qualvolle Arbeit mit dem Mikrotome und an den Farbnäpfen erleichtert, von Sieben herrühren, das ist über die Mauern Bonns und über den Schülerkreis meines hochverehrten Herrn Vorgängers kaum hinausgedrungen. Tatsächlich aber ist es der Verfasser dieses Büchleins gewesen, der auf Anregung Strasburgers in jahrzehntelangen Bemühungen die Mikrotechnik für die Pflanzen ausgebildet, alle neu auftauchenden Rezepte geprüft und für pflanzliche Objekte umgearbeitet hat, und der, nicht zuletzt, die vielen Tausende von Präparaten für Strasburgers Arbeiten nicht nur an-

gefertigt, sondern auch für Strasburger durchgesehen und mit wissenschaftlichem Verständnisse ausgesucht hat.

So wird man es, denke ich, mit Freude begrüßen, daß Sieben sich nach dem Heimgange seines Herrn und Meisters entschlossen hat, seine Erfahrungen, die er mündlich weiterzugeben bisher in Bonn reichliche Gelegenheit hatte, auch weiteren Kreisen zugänglich zu machen. Wenn man in seinen Angaben auf manche allbekannte Vorschriften stößt, so denke man also mit Dankbarkeit daran, daß der, der sie gibt, die geistige Urheberschaft dafür in Anspruch nehmen kann. Aber auch Forscher, denen die moderne Mikrotechnik nicht mehr fremd ist, werden genügend Gelegenheit finden, sich unter der Anleitung des Verfassers weiter darein zu vertiefen. Möge dieses Buch also dazu beitragen, daß die Traditionen des Bonner Institutes in der Mikrotechnik für die Wissenschaft nicht verloren gehen. Dieser Wunsch muß Niemandem mehr als mir am Herzen liegen.

H. Fitting.

Vorwort.

In den langen Jahren, während welcher ich am botanischen Institut zu Bonn mich mit mikrotechnischen Arbeiten zu befassen und die Praktikanten des Instituts in die cytologische Methodik einzuführen hatte, ist seitens der Herren Studierenden oft der Wunsch ausgesprochen worden, daß ich die botanischen Untersuchungsmethoden, wie sie von mir ausgearbeitet und erprobt worden sind, in allgemein verständlicher Fassung veröffentlichen möchte. Diesem Wunsche komme ich mit der Herausgabe des vorliegenden Büchleins nach; ich teile darin alles das mit, was der Anfänger zur cytologischen Untersuchung botanischer Objekte wissen muß, und gebe es in derselben Form, in der ich es mündlich viele Jahre lang gelehrt habe. Ich habe mich bemüht, alles eingehend und möglichst leicht verständlich darzustellen, damit auch der, der bei Erlernung der Mikrotechnik auf sich selbst angewiesen ist, das Buch mit Nutzen zu Rate ziehen könne.

Bei der Vorbereitung und Herausgabe des Büchleins bin ich von verschiedenen Seiten in außerordentlich freundlicher Weise unterstützt worden: Herr Professor Fitting hatte die Güte, dem Texte eine Einführung vorauszuschicken; Herr Professor Küster hat mich bei der Abfassung des Manuskriptes und der Herausgabe des

Buches ständig durch seine mir wertvollen Ratschläge unterstützt. Beiden Herren sage ich meinen ergebensten Dank. Vor allem habe ich aber hier in Dankbarkeit und Treue meines verstorbenen Chefs, des Herrn Geh. Rat Prof. Strasburger zu gedenken, der mich vor mehr als zwei Jahrzehnten in die botanische Mikrotechnik einführte und in seiner gütigen Art mich stets bei meinen Arbeiten zu fördern gewußt hat. Die Erinnerung an die vielen Stunden, die ich neben ihm am Arbeitstische verbracht habe, wird mir immer teuer bleiben.

Herrn Dr. Gustav Fischer danke ich bestens für sein Entgegenkommen und für die gute Ausstattung, die er dem Büchlein gegeben hat.

Bonn, im Frühjahr 1913.

Hubert Sieben.

Einleitung.

Schaut man zurück in die siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts, so findet man, daß damals von einer botanischen cytologischen Technik kaum die Rede war. Während die Zoologen schon ihre Objekte vor der mikroskopischen Verarbeitung mit Alkohol, Essigsäure, Chromsäure und Kaliumbichromat behandelten, auch die Kerne mit Karmin und Hämatoxylinfarben deutlich sichtbar zu machen verstanden, galt auf botanischem Gebiete noch der Grundsatz, daß der Zellinhalt nur lebend untersucht werden dürfe. Eduard Strasburger war der erste Botaniker, der mit diesem einseitigen Prinzip ein Ende machte, indem er 1874 Samenanlagen von Koniferen mit Alkohol härtete und dann schnitt. So gelang es ihm, gleichzeitig mit dem Zoologen O. Bütschli, die bisher nur lückenhaft und unzutreffend beschriebenen Teilungsvorgänge des Zellkernes genauer zu verfolgen. Dies war der Beginn seiner ausgedehnten Forschungen auf dem Gebiete der Zellenforschung, die durch ihn eine so mächtige Förderung erfuhr.

Die Zoologen blieben hinsichtlich der Kunst, ihre Objekte zu fixieren und zu färben, den Botanikern zunächst noch immer weit voraus. Ja gerade jetzt nahm ihre Technik durch die sorgfältigen Arbeiten W. Flemmings einen gewaltigen Aufschwung. Wiederum war

es Strasburger, der sich zuerst entschloß, sich mit allen auf zoologischem Gebiet angewandten Methoden vertraut zu machen und sie auf ihre Brauchbarkeit für pflanzliche Objekte zu prüfen. Bald stand auch die Technik der botanischen Cytologen auf derselben Höhe wie die der Zoologen. Die Folgezeit brachte eine sehr große Zahl von Fixierungs- und Färbemethoden, zum Teil recht umständlicher Art, die später meist wieder verlassen wurden. Im einzelnen wurden natürlich viele Verbesserungen erzielt. Wesentliche Fortschritte bedeuteten zwei zu gleicher Zeit (1891/92) bekanntgegebene Färbemethoden, die auch heute noch unübertroffen sind, Flemmings Dreifarbenmethode und die Heidenhainsche Färbung mit Eisenalaun und Hämatoxylin.

Außer den Fortschritten in den Fixier- und Färbemethoden sind es vor allem zwei Umstände gewesen, die die Technik der Mikroskopie auf ihre jetzige Höhe gebracht haben. Der erste war die durch Ernst Abbe in Jena herbeigeführte außerordentliche Verbesserung der Mikroskope, die durch die Konstruktion der Apochromate gekrönt wurde. Strasburger hat beim Unterricht oft darauf hingewiesen, daß selbst der geübte Forscher vor 1870 Dinge nicht habe sehen können, die man jetzt dem Anfänger in der ersten Stunde ohne Schwierigkeit unter dem Mikroskope zu zeigen imstande sei.

Der zweite der Technik förderliche Umstand war die Einführung der Mikrotome verschiedenster Konstruktion. Diese Instrumente gestatteten es, Schnitte von einer bis dahin niemals erreichten Feinheit und Regelmäßigkeit anzufertigen. Dem modernen Mikroskop und dem Mikrotom haben wir zum allergrößten Teil das schnelle Fortschreiten unserer Kenntnisse vom Bau der Zelle zuzuschreiben.

Damit sind ganz kurz die wichtigsten Punkte aus der

Geschichte der cytologischen Technik gestreift.[1]) Im folgenden sollen nun die Methoden näher geschildert werden, die in den letzten Jahren im Bonner botanischen Institut angewandt worden sind. Es kann nicht meine Absicht sein, eine große Reihe von Fixierungs- und Färbeweisen zusammenzustellen;[2]) vielmehr will ich versuchen, einige besonders bewährte Verfahren recht genau und allgemeinverständlich darzustellen, so daß auch der wenig Geübte und der Anfänger bei sorgfältiger Befolgung der Vorschriften keine allzugroßen Fehler begehen werden. Überhaupt schwebte mir bei Abfassung des Buches als Ziel vor, dem Anfänger eine Reihe von Rezepten und Vorschriften an die Hand zu geben und ihn mit der technischen Seite der botanischen Cytologie in derselben Weise bekannt zu machen, wie ich es seit Jahren im Bonner Institut auf mündlichem, praktischem Wege getan habe. Demgemäß entspricht die Anordnung der Kapitel der Reihenfolge von Manipulationen, welchen das Objekt bei seiner Verarbeitung unterworfen werden muß.

Kapitel I.

Fixieren.

Der erste Schritt zur Präparation eines Objekts ist die Fixierung, durch welche der Inhalt der lebenden

---

[1]) Ausführlicheres in: Moll, Die Fortschritte der mikroskop. Technik seit 1870. Progr. rei bot. II 1907.

[2]) Hierfür verweise ich auf Behrens-Küster, Tabellen zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten (8. Auflage, Leipzig 1908), sowie auf Lee-Mayer, Grundzüge der mikroskopischen Technik (4. Auflage, Berlin 1911).

Zellen getötet werden soll. Es muß zwar auf das nachdrücklichste betont werden, daß die Lebendbeobachtung niemals vernachlässigt werden darf. Leider läßt sie sich aber bei Untersuchung pflanzlicher Zellen nicht immer durchführen, am wenigsten dann, wenn es sich um Vorgänge wie Befruchtung usw. handelt, obwohl sie auch dann an günstigen Objekten nicht unmöglich ist (Monotropa,[1]) Staubfadenhaare von Tradescantia). Wo sie sich eben durchführen läßt, soll es auch geschehen. Im allgemeinen arbeitet aber die Cytologie mit fixierten Objekten.

A. Der Zweck des Fixierens

ist nicht nur der, das Objekt zu töten. Das Objekt soll sich dabei gar nicht oder doch möglichst wenig verändern, also bis in die feinsten Einzelheiten später dieselben Verhältnisse zeigen, die es auch im Leben aufgewiesen hat.

Ferner soll es so beeinflußt werden, daß es ohne Veränderung die später notwendige Behandlung verträgt (Härtung!). Diese strengen Forderungen erfüllt aber eigentlich kein Fixierungsmittel ganz. Man wird eine Fixierung gut nennen dürfen, wenn wenigstens das, worauf es bei der Untersuchung gerade ankommt, gut erhalten ist.

B. Vorprüfung des Materials.

Vor dem eigentlichen Fixieren wird es, besonders, wenn das Material nur in geringen Mengen vorliegt, von Vorteil sein, sich zu überzeugen, ob im Objekt bereits die Zustände erreicht sind, welche man zu sehen wünscht.

---

[1]) Vgl. Strasburger, Bemerkungen zur Frage nach der doppelten Befruchtung. Bot. Ztg. 1900.

Man bedient sich zu dieser vorläufigen Orientierung gern der Methylgrün-Essigsäure, die man anfertigt durch Mischen von

100 ccm dest. Wasser,
2 ccm Eisessig
und 0,5 g Methylgrün.

Es handele sich beispielsweise um die Pollenentwicklung einer Pflanze. Man öffnet eine Blüte, nimmt einige Antheren heraus und legt sie auf dem Objektträger in einige Tropfen der Methylgrün-Essigsäure. Nun zerdrückt man die Antheren mit dem stumpfen Ende einer Pinzette, bis ihre Fächer aufspringen. Es lösen sich dabei viele Pollenmutterzellen ab und werden alsbald von der Flüssigkeit gleichzeitig fixiert und tingiert. Nun legt man ein Deckglas auf, wobei man möglichst das Entstehen von Luftblasen zu vermeiden sucht. (Nötigenfalls beseitigt man entstandene Blasen durch Drücken mit der Pinzette auf das Deckglas.) Liegen die zur Färbung bestimmten Objekte bereits im Wasser unter Deckglas, so kann man auch derart verfahren, daß man an einer Seite an den Rand des Deckgläschens einen Tropfen Methylgrünessigsäure bringt und ihn auf der anderen Seite mit Fließpapier nachsaugt. Man überzeugt sich nun unter dem Mikroskop, ob die gewünschten Teilungsstadien vorhanden sind. Sind die Antheren zu jung oder zu alt, so geht man zu anderen Blüten über, bis man ermittelt hat, welche Größe die Antheren haben müssen, damit sie den Ansprüchen genügen. Solche fixiert man alsdann.

C. Zeitpunkt des Fixierens.

Um Pollen- und Embryosackentwicklung der höheren Pflanzen zu studieren, fixiert man sein Material zweck-

mäßig am Morgen. Nach meinen Erfahrungen trifft man nämlich des Morgens die meisten Kernteilungen an.

Wenn einige Tage dunkles, trübes Wetter geherrscht hat und dann ein heller, sonniger Tag folgt, kann man sicher sein, bei der Fixierung vielen Kern- und Zellteilungen zu begegnen.

D. Allgemeine Maßregeln für das Fixieren.

1. Die Objekte müssen beim Einlegen in die Fixiermittel stets ganz frisch sein. Würde man Pflanzen, die nach dem Abpflücken stundenlang in der Botanisierbüchse verweilt haben, fixieren, so müßte man sich bei der späteren Färbung auf Strukturen gefaßt machen, die den normalen nicht entsprechen, da eben vor dem Fixieren schon Veränderungen stattgefunden haben. Dementsprechend wird man auch z. B. Wurzelspitzen direkt über dem Fixiermittel abschneiden, so daß sie in dasselbe hereinfallen, oder, wenn sie am Messer hängen bleiben, sogleich hineingeworfen werden können.

2. Man nehme im Verhältnis zur Menge der fixierten Objekte große Mengen der Fixierungsflüssigkeit; sie könnte sonst durch die im Objekt enthaltenen Stoffe zu stark in ihrer Zusammensetzung verändert werden und dabei an Wirksamkeit verlieren. Bei sehr kräftig wirkenden Mitteln, z. B. dem Flemmingschen Gemisch, kann man geringere Mengen Fixierungsflüssigkeit nehmen, während man bei allen Gemischen, die Alkohol höherer Konzentration enthalten, die Regel genau innehalten muß.

3. Man sorge für schnelles und gleichmäßiges Eindringen der Fixiermittel. Bei Mißachtung dieser Maßregel wird das Objekt zu langsam getötet, und es treten vor der

Fixierung Giftwirkungen auf, die den protoplasmatischen Strukturen Veränderungen aufzwingen, die dann später im Bilde erscheinen. Bei einer guten Fixierung aber muß das lebende Protoplasma in seinem noch völlig normalen Zustand sozusagen vom Tode überrascht werden.

a) Man fixiere daher möglichst kleine Objekte, oder zerlege größere in so kleine Stücke, wie es die Untersuchung zuläßt. Will man z. B. Antheren fixieren, so werfe man nicht die ganzen Blüten in das Fixiermittel, sondern präpariere die Antheren aus ihnen heraus, wenn nicht die geringe Größe der Blüten das unmöglich oder auch unnötig macht. Hat man die Absicht, große Fruchtknoten zu untersuchen, so wird man sie nicht ganz der Fixierung unterwerfen, sondern sie vorher nochmals der Quere nach zerteilen, damit die Flüssigkeit schnell eindringt.

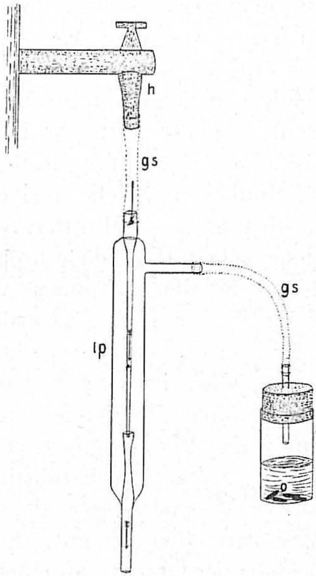


Fig. 1. Wasserstrahl-Luftpumpe. *h* Wasserhahn. *gs* Gummischlauch. *lp* Luftpumpe. *c* Cylinderglas. *o* Objekte.

b) Die Objekte müssen gleich zum Untersinken gebracht werden, damit das Fixiermittel sie vollständig umspült. Wenn sie nicht von selbst untersinken, muß eine Luftpumpe zu Hilfe genommen werden.

Man bedient sich zweckmäßig einer kleinen Wasserstrahlluftpumpe (vgl. Fig. 1). Dem Gläschen, das die Objekte enthält, setzt man einen Kork auf, durch welchen

ein Glasrohr geführt ist, und verbindet dieses durch einen Gummischlauch mit dem Seitenrohr der an der Wasserleitung befestigten Luftpumpe, die man dann vom Wasser durchströmen läßt. Schnell wird die Luft aus dem Gefäß, dem Fixiergemisch und den Objekten (Intercellularen) entfernt, was man am Aufsteigen der Blasen erkennt. Die Objekte sinken dann unter und werden vom Fixiergemisch vollends durchtränkt. Man hat dabei nur darauf Acht zu geben, daß das Leitungswasser nicht in das Gefäß eindringe. Man drehe daher nach Beendigung der Manipulation, welche übrigens nicht zu lange dauern darf (höchstens 2—3 Minuten), nicht den Hahn ab, sondern ziehe zuerst das Glasröhrchen aus dem Gummischlauch, der es mit der Luftpumpe verbindet. Ist trotz aller Vorsicht Wasser in die Fixierflüssigkeit gedrungen, so ist sie sofort durch neue zu ersetzen.

c) Oft wird es gut sein, den Boden des Gefäßes mit Watte oder Fließpapier zu bedecken, so daß auch von unten das Fixiergemisch einwirken kann.

d) Nach alter Erfahrung dringen die Fixiergemische in der Wärme besser als bei niedriger Temperatur ein. Man tut daher oft gut, das Fixiergefäß nach dem Einbringen der Objekte an einen warmen Ort (Wärmeschrank, vgl. S. 27) zu stellen.

E. Fixiermittel.

Von der großen Zahl der für cytologische Arbeiten empfohlenen Fixiermittel sind im Bonner botanischen Institut hauptsächlich folgende benutzt worden:

1. Osmiumsäure.

Sie wird in kleinen zugeschmolzenen Röhrchen bezogen und aufbewahrt. Wir wählen solche von $^1/_2$ g Inhalt.

Ihre Verwendung findet die Osmiumsäure hauptsächlich in Gemischen (vgl. S. 12, 13, 14, 16, 17). Die wässerige Lösung ohne weitere Zusätze wird wohl nur für sehr kleine Objekte (z. B. Algen und ihre Schwärmer usw.) verwandt. Man fixiert solche mit Osmiumsäuredämpfen in der Weise, daß man die Objekte auf Deckgläschen oder Objektträgern in einem Wassertropfen unterbringt, dann das Präparat schnell umdreht und es so über den Hals der Flasche hält, daß der Wassertropfen in der Mündung hängt und den Osmiumdämpfen ausgesetzt ist. Nach einigen Minuten ist die Fixierung vollzogen.

Osmiumsäurelösung zersetzt sich leicht, besonders im Licht. Setzt man ihr aber einige Tropfen konzentrierter Sublimatlösung zu (auf 100 ccm 10 Tropfen), so wird sie haltbar (P. Mayer). Beim Hantieren mit Osmiumsäure und ihren Gemischen ist Vorsicht geboten, da die Dämpfe die Augen stark angreifen.

Die Osmiumsäure dringt sehr schlecht in die Gewebe ein, ebenso die mit ihr bereiteten Gemische. Man muß also möglichst kleine Objekte in sie einlegen (Luftpumpe), braucht aber von ihr nicht viel zu nehmen, weil sie sehr energisch wirkt.

Das Auswaschen nimmt man in fließendem Wasser vor. In Osmiumsäure und ihren Gemischen schwärzen sich die Objekte mehr oder weniger, was die Färbung und spätere Beobachtung erschwert. Die Schwärzung beseitigt man, indem man die Objektträger mit den aufgeklebten Schnitten einige Zeit bis zur völligen Bleichung in käufliches Wasserstoffsuperoxyd stellt.

2. Chromsäure.

Sie zerfließt leicht, weil sie Wasser anzieht. Es empfiehlt sich daher, die Chromsäure nicht in Substanz,

sondern in 1proz. wässeriger Lösung aufzubewahren. Als solche wird sie zum Fixieren verwandt. Über chromsäurehaltige Gemische s. u. Das Auswaschen von Objekten, die mit chromhaltigen Gemischen fixiert sind, erfolgt meist mit Wasser. Will man Alkohol dazu benutzen, so arbeitet man im Dunkeln, um Niederschläge zu vermeiden.

3. Kaliumbichromat.

Als guter Plasmafixierer in Gemischen, besonders für Chondriosomenstudien (S. 16) verwandt. Ausgewaschen wird mit Wasser.

4. Sublimat.

Es dringt in pflanzliche Objekte schlecht ein. Man vermeide, mit stählernen Instrumenten in die Lösungen zu kommen, da sonst Niederschläge entstehen. Dem Alkohol, mit dem man auswäscht, ist etwas Jodtinktur oder Jodjodkalium zuzusetzen. Das Jod wird durch weiteres Waschen mit Alkohol beseitigt. Heidenhainsche Sublimatlösung wird hergestellt, indem man 0,5proz. Kochsalzlösung mit Sublimat sättigt.

5. Essigsäure.

Reine konzentrierte Essigsäure bezeichnet man als Eisessig. Anwendung der Essigsäure mit Methylgrün für Orientierungspräparate siehe S. 5. Da Essigsäure die Chondriosomen angreift, dürfen die Fixiergemische, wenn diese Gebilde erhalten bleiben sollen, keine Essigsäure enthalten (vgl. S. 16, Benda, Regaud). Essigsäure wird in 8—10proz. Lösungen zum Fixieren benutzt. Auswaschen mit Wasser.

6. Pikrinsäure.

Nur in konzentrierter wässeriger oder alkoholischer Lösung zu verwenden. Die Objekte werden je nach dem angewandten Lösungsmittel mit Alkohol oder Wasser

ausgewaschen; letzteres darf nicht zu lange (etwa 10 bis 20 Minuten) auf die Objekte einwirken, da diese sonst zerfallen.

7. Alkohol.

Er dringt schnell in die Objekte ein. Wird Alkohol allein zum Fixieren gebraucht, was übrigens selten geschieht, so muß er ganz wasserfrei sein. Der käufliche absolute Alkohol ist dies nicht. (Wasser im Alkohol erkennt man am leichtesten, wenn man ein wenig Calciumcarbid hineinwirft. Entsteht Acetylengas, so ist Wasser vorhanden.) Man kann aber das Wasser bis auf geringe Spuren entfernen durch Kupfervitriol, das man durch starkes Glühen von seinem Kristallwasser befreit hat. Zu diesem Zweck zerstößt man die blauen Kristalle in einer Reibschale zu Pulver, gibt dieses in einen Porzellantiegel und erhitzt es so lange, bis es ganz weiß geworden ist. Dann bringt man es, gut in Filtrierpapier eingewickelt oder in kleine Leinensäckchen eingenäht, in den wasserhaltigen Alkohol. Von Zeit zu Zeit ist das Kupfervitriol natürlich zu erneuern. Für die meisten anderen Zwecke ist übrigens der käufliche absolute Alkohol wasserfrei genug.

Außer zur Herstellung von Fixiergemischen wird der Alkohol noch als Durchgangsflüssigkeit vor der Paraffindurchtränkung und dem Harzeinschluß, zum Differenzieren von Färbungen, als Auswaschmittel bei Verwendung anderer Fixiermittel, sowie zum Aufbewahren von Objekten (S. 19, 20) in den verschiedensten Stärkegraden benutzt.

Ein Auswaschen der fixierten Objekte ist bei Fixierung mit reinem Alkohol überflüssig.

Die folgenden drei Substanzen werden niemals für sich allein, sondern stets nur in Gemischen (s. nächster Abschnitt) mit anderen Stoffen zum Fixieren verwandt:

a) Platinchlorid,
b) Zinkchlorid,
c) Formalin.

F. Fixiergemische.

Es ist klar, daß die angeführten Fixiermittel nicht alle dieselben Eigenschaften besitzen. Um ihre Vorzüge vorteilhaft miteinander zu vereinen, hat man die fixierenden Substanzen zu Gemischen verbunden. In der Tat erzielt man mit diesen weit bessere Wirkungen als mit den ungemischten Fixiermitteln, und daher haben die Gemische den letzteren vollständig den Rang abgelaufen. Im folgenden sollen aus der großen Fülle von Fixiergemischen diejenigen zusammengestellt und besprochen werden, die sich nach längerer Erfahrung für pflanzliche Zellenstudien am meisten bewähren.

1. Chrom-Osmium-Essigsäure (Flemmingsche Lösung).

Die gebräuchlichsten im Bonner Institut für pflanzliche Objekte ausgeprobten Fixiergemische sind die Flemmingschen Lösungen. Wir wenden eine schwächere und eine stärkere Konzentration an.

a) Das schwächere Gemisch (Mittelflemming).

180	ccm	1 proz. Chromsäure,
25	,,	2 proz. Osmiumsäure,
12	,,	Eisessig,
210	,,	dest. Wasser.

Oben wurde schon bemerkt, daß wir die Osmiumsäure in geschlossenen Glasröhrchen zu $^1/_2$ g beziehen. Das geschieht aus dem Grunde, weil man sonst bei der Herstellung des Flemmingschen Gemisches zu große Mengen desselben erhält. Dieselbe geht so vor sich: Das Osmium-

röhrchen mit $^1/_2$ g Inhalt wird in eine Flasche mit eingeschliffenem Glasstopfen geworfen. Durch starkes Schütteln der Flasche zerbricht man das Röhrchen; der Inhalt fällt heraus und wird mit 25 ccm destilliertem Wasser versetzt. Die Flasche stellt man 12—15 Stunden ins Dunkle. Während dieser Zeit hat sich die Osmiumsäure völlig gelöst; dann erst werden die übrigen Bestandteile zugesetzt.

Wir bewahren die Lösung, um jeder Zersetzung sicher vorzubeugen, stets in dunkelbraunen Flaschen auf.

Die vorzügliche Wirkung der Flemmingschen Lösung kann nur an kleinen Objekten voll zur Geltung kommen. Daher schneidet man z. B. Antheren vor der Fixierung der Quere nach durch und wirft die beiden Hälften in die Flüssigkeit.

In der Fixierungsflüssigkeit müssen die Objekte nach unserer Erfahrung zwei Tage verweilen. Dann werden sie $1^1/_2$—2 Stunden unter der Wasserleitung ausgewaschen.

b) Eine stärkere Flemmingsche Lösung, die auch im Bonner botanischen Institut viel angewandt wurde, setzt sich folgendermaßen zusammen:

15	ccm	1 proz. Chromsäure,
2	,,	2 proz. Osmiumsäure,
1	,,	Eisessig,
10	,,	dest. Wasser.

Dieses Gemisch wurde nur für größere Objekte benutzt, z. B. für große Fruchtknoten, Samenanlagen, Gefäßbündel, Blätter usw. Man sehe zu, daß die Objekte gut angeschnitten und so klein präpariert werden, wie es eben möglich ist. Behandlungsart und Fixierungsdauer sind dieselben wie bei dem schwächeren Gemisch.

2. Hermannsches Gemisch: Platinchlorid-Osmiumsäure-Eisessig.

15 ccm 1proz. Platinchlorid,
2 „ 2proz. Osmiumsäure,
1 „ Eisessig,
18 „ dest. Wasser.

Diese Lösung hat uns bei älteren wie jüngeren Objekten meist gute Resultate geliefert. Auch in diesem Gemisch verbleiben die Objekte zwei Tage. Auswaschen wie bei den Flemmingschen Gemischen.

3. Juelsches Gemisch I: Chromsäure-Platinchlorid-Eisessig.

25 ccm 2proz. Chromsäure,
2,5 g 10proz. Platinchlorid,
1 ccm Eisessig,
75 „ dest. Wasser.

Dieses Fixiermittel wurde mit gutem Erfolg bei Pollenmutterzellen sowie Embryosackmutterzellen verwertet. Bei älteren Objekten wirkt sie nicht ganz so gut. Man wähle für solche eine andere Fixierung.

Anwendung wie bei Flemmingschen Lösungen.

4. vom Rathsches Gemisch: Pikrinsäure-Osmiumsäure-Eisessig.

100 ccm wässerige gesättigte Lösung von Pikrinsäure,
6 „ 2proz. Osmiumsäure,
2 „ Eisessig.

Diese Lösung ist auch bei jüngeren und älteren Objekten, Pollenkörnern, Fruchtknoten, Gefäßbündeln usw. mit dem besten Erfolg angewandt worden. Die Pikrinsäure färbt die Gewebe gelb, was aber keinen Nachteil bedeutet. Die Pikrinpräparate können durch Zusatz von einigen Tropfen einer kalt gesättigten wässerigen Lösung von Lithium carbonicum zu dem Alkohol, mit dem man die

Entwässerung vornimmt, leicht entfärbt werden. Man wäscht sie nur 10 Minuten im Wasser aus und fängt dann sogleich mit der Entwässerung (siehe Kapitel IV) an.

Fixierungsdauer wie beim Flemmingschen Gemisch.

5. Juelsches Gemisch II: Zinkchlorid-Eisessig-Alkohol.

2 g		Zinkchlorid,
2 ccm		Eisessig,
100	,,	50proz. Alkohol.

Im Bonner botanischen Institut verwendet man statt des 50proz. lieber 80proz. Alkohol. Das Gemisch dringt gut ein und ergibt bei vielen pflanzlichen Objekten sehr gute Resultate, besonders auch bei älteren Stadien der Samenanlagen, Gefäßbündeln, Blättern usw.

Die Objekte bleiben 24 Stunden in dem Gemisch. Dann gelangen sie in reinen 80proz. Alkohol, den man innerhalb 6—8 Stunden 3—4mal wechselt. Hierauf werden sie weiter entwässert, wie in Kapitel IV angegeben ist.

6. Carnoysches Gemisch: Alkohol-Eisessig.

80 ccm	absol. Alkohol,
20 ,,	Eisessig.

Dieses Gemisch dringt gut ein und hat uns besonders bei der Untersuchung älterer Stadien des Embryosacks, der Gefäßbündel usw. gute Dienste geleistet. Die Objekte verbleiben 24 Stunden in der Fixierungsflüssigkeit. Man wäscht sie 8—10 Stunden, alle zwei Stunden wechselnd, mit Alkohol absolutus aus, bis kein Eisessiggeruch mehr zu spüren ist, und bringt sie sogleich in ein Gemisch von Alkohol und Chloroform zu gleichen Teilen usw. (vgl. S. 22).

7. Sublimat-Eisessig nach Kaiser besteht aus

10 g Sublimat,
3 g Eisessig,
300 g dest. Wasser.

Siehe die Bemerkungen bei Sublimat (S. 10).

In neuerer Zeit hat man als wichtige Bestandteile der Zelle die Chondriosomen (Plastochondrien, Mitochondrien usw.) erkannt. Ist man auch über ihre Reaktionen noch nicht ganz im klaren, so weiß man doch, daß Osmiumsäure, Chromsäure, Kaliumbichromat und Formalin sie erhalten, Alkohol und Essigsäure sie dagegen zerstören. Letztere dürfen deshalb, wenn überhaupt, nur in ganz geringen Mengen den Fixierungsflüssigkeiten zugesetzt werden. Von den für Chondriosomenstudien benutzten Flüssigkeiten führen wir die zwei gebräuchlichsten unter den beiden folgenden Nummern an:

8. Fixiergemisch nach Benda für Chondriosomen.

15 ccm 1 proz. Chromsäure,
4 „ 2 proz. Osmiumsäure,
3 Tropfen Eisessig.

Die Objekte bleiben fünf Tage in diesem Fixiergemisch. Auswaschen und Härten wie bei dem Flemmingschen Gemisch.

9. Fixiergemisch nach Regaud für Chondriosomen.

80 ccm 3 proz. Kaliumbichromat,
20 „ käufl. Formol.

Einwirkungszeit 4 Tage.

Regaud behandelt noch mit reinem 3 proz. Kaliumbichromat nach. Auswaschen in fließendem Wasser. Dieses Gemisch ist vor jeder Fixierung frisch zu bereiten.

Solche Objekte, die Kalk enthalten (Corallinaceen, Acetabularia u. a. Algen, auch z. B. befruchtete Eizellen von Characeen), werden am besten in einer Flüssigkeit fixiert, die neben den fixierenden auch kalklösende Bestandteile enthält. Als eine solche Flüssigkeit ist folgendes Gemisch zu empfehlen.

10.	3 ccm	offizinelle Salzsäure,
	5 „	1 proz. Chromsäure,
	5 „	1 proz. Osmiumsäure,
	5 „	absoluter Alkohol.

Die Objekte verweilen darin etwa 48 Stunden. Weiterbehandlung wie bei der Fixierung mit dem Flemmingschen Gemisch.

Hat man bereits fixiert, so geschieht die Entfernung des Kalkes durch Einbringen der Objekte in ein Gemisch von

70 proz. Alkohol	100 Vol.
off. Salpetersäure	3—5 Vol.

(oder in 10 proz. Milchsäurelösung). Das Entkalkungsmittel ist öfter zu wechseln und nach Erfüllung seines Zwecks gut auszuwaschen (Kap. II).

Kapitel II.

Das Auswaschen.

Sobald die Fixierung vollendet ist, beginne man mit dem Auswaschen.

Dieser Zeitpunkt wird von den verschiedenen Fixiermitteln verschieden schnell erreicht (vgl. die Angaben des vorigen Kapitels).

Zum Auswaschen dienen Wasser oder Alkohol. Bei manchen Fixiermitteln ist nur eines von beiden angebracht; z. B. ist bei Pikrinsäurefixierung Wasser sehr schädlich.

Das Waschmittel muß reichlich vorhanden sein und oft gewechselt werden. Am einfachsten ist es, das Auswaschen mit Wasser unter der Wasserleitung vorzunehmen. Um das Fortspülen der Objekte zu verhindern, kann man sie in ein Fairchildsches Siebeimerchen bringen, das man oben mit einem Kork verschließt und in einem Glase dem Wasserstrome aussetzt (Fig. 2). Hat man ein solches Siebeimerchen nicht zur Hand, oder sind die Objekte so klein, daß sie seine Öffnungen noch passieren können, so hilft man sich, indem man über das die Objekte enthaltende Gläschen ein Stück feiner Gaze bindet und es dann unter der Wasserleitung einem mäßig starken Strahl aussetzt. Die Objekte müssen sich im Wasser hin und her bewegen, da dies das Auswaschen sehr befördert.

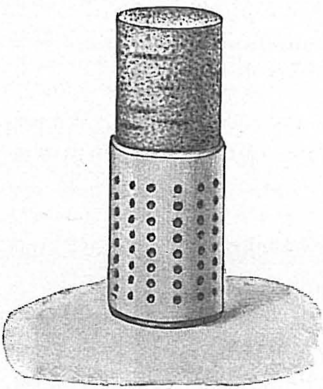


Fig. 2. Fairchildsches Siebeimerchen.

Die Dauer der Prozedur soll im allgemeinen zwei Stunden nicht überschreiten. Wir haben gefunden, daß ein längeres Auswaschen die botanischen Objekte brüchig macht und ihnen auch sonst schadet.

Kapitel III.

Das Aufbewahren der Objekte.

Nach beendetem Fixieren und Auswaschen wird man im allgemeinen die Objekte sofort weiter zu Präparaten verarbeiten, was auch am meisten zu empfehlen ist. Ist man aber aus irgendwelchen Gründen gezwungen, damit zu warten, so lassen sich die Objekte in verschiedener Weise aufbewahren. Dabei sollen sie sich natürlich nicht zersetzen oder sonst ändern. Zum mindesten muß man demnach noch die im folgenden Abschnitt erläuterte Entwässerung durch Alkohol vornehmen. Man bringt also die Objekte in 70—80proz. Alkohol, in dem sie bleiben können. Ein Übelstand, den diese Behandlungsweise mit sich bringt, ist der, daß die Objekte darin schnell hart und brüchig werden. Auch Formalin ist zur Aufbewahrung empfohlen worden. Dieses verlangt natürlich keine vorherige Entwässerung, hat aber denselben Nachteil wie Alkohol und setzt manchmal die Färbbarkeit des Materials stark herab. Empfehlenswert ist das Strasburger-Flemmingsche Aufbewahrungsgemisch

Abs. Alkohol	1	Vol.
Glyzerin	1	„
dest. Wasser	1	„

Die Flüssigkeit erhält die Objekte gut, ohne sie hart zu machen. Zur weiteren Verarbeitung braucht man sie nachher nur in 70proz. Alkohol zu bringen und dann die Entwässerung fortzusetzen.

Manche führen die Entwässerung sofort vollständig durch und bringen dann die Objekte in Zedernöl, in dem sich die Präparate unbegrenzt halten. Ist man aber ein-

mal soweit gegangen, so kann man sie auch ebenso gut in Paraffin einbetten. Wir haben dies immer vorgezogen; denn die Aufbewahrung in Paraffin ist nicht allein die sicherste, sondern auch die bequemste und sauberste, daher allen anderen Verfahren weit vorzuziehen. —

Hier sind vielleicht noch einige Bemerkungen über die Versendung von Objekten angebracht. Vor der Versendung müssen die fixierten Objekte ausgewaschen, entwässert und in 85proz. Alkohol gebracht werden. Die Gefäße wählt man der Größe der Objekte entsprechend und füllt sie möglichst ganz mit der Flüssigkeit, damit die Objekte nicht durch zu starkes Schütteln beschädigt werden.

Kapitel IV.

Entwässern.

Nach dem Auswaschen der Objekte muß zunächst alles Wasser aus ihnen entfernt werden. Man verdrängt es durch Alkohol, falls sie nicht mit absolutem Alkohol ausgewaschen worden sind (siehe oben, Carnoysches Gemisch). Man schüttet das letzte Waschwasser vorsichtig von den Objekten ab und ersetzt es durch 30proz. Alkohol, den man zwei Stunden einwirken läßt. Auf dieselbe Weise bringt man die Objekte weiterhin

2	Stunden	in	50proz.	Alkohol,
2	,,	,,	70 ,,	,,
2	,,	,,	85 ,,	,,
20—24	,,	,,	96 ,,	,,

der während dieser Zeit einmal erneuert wird. Hierauf kommen sie 6—8 Stunden in Alkohol absolutus, der ebenfalls einmal zu wechseln ist. Diese vorsichtigen Maß-

nahmen sind nötig, damit die Objekte nicht infolge zu schneller Wasserentziehung schrumpfen und dadurch unbrauchbar werden. Einige Botaniker gehen in der Vorsicht so weit, daß sie verlangen, die Entwässerung mit 5proz. Alkohol zu beginnen und die Objekte nacheinander mit Zwischenräumen von je einer Stunde in 10proz., 15proz., 20proz. usw. bis 100proz. Alkohol zu bringen. Eine solche Vorsicht scheint uns für die allermeisten Objekte zu weitgehend; angewandt wurde das Verfahren der langsamen Entwässerung von uns nur für zartere Algen. Bei Verwendung des Juelschen Zinkchloridgemisches (siehe oben) fallen beim Entwässern die ersten Stufen der Alkoholbehandlung selbstverständlich fort.

Müssen aus irgendeinem Grunde Objekte aus starkem Alkohol in schwächeren gebracht werden, so kann dies ohne Einschaltung von Zwischenstufen geschehen. Bei der Rückbeförderung in einen stärkeren Alkohol ist aber der eben geschilderte Weg genau einzuhalten. Aus dem folgenden wird hervorgehen, daß die auf Objektträger aufgeklebten Schnitte von uns nicht mit dieser Vorsicht behandelt, sondern z. B. aus Wasser direkt in 95proz. Alkohol gebracht werden. Wer von diesem Vorgehen schädigende Wirkung erwartet, möge als Zwischenstufe 50proz. oder 70proz. Alkohol einschalten.

Kapitel V.

Das Durchtränken mit Paraffin.

Die weiteren Manipulationen sollen dazu führen, das Objekt mit einem bei Zimmertemperatur festen Medium zu durchtränken, damit es die zum Schneiden mit dem

Mikrotom erforderliche Festigkeit gewinne. Als solche Substanz kommt für unsere Zwecke Paraffin in Betracht.

Um die Durchtränkung der Objekte mit Paraffin zu erreichen, muß zuerst der absolute Alkohol durch eine wasserfreie Flüssigkeit ersetzt werden, die sich mit Paraffin klar mischt. Solcher Flüssigkeiten gibt es viele; nur sind sie nicht alle gleich brauchbar für die hier zu besprechende Aufgabe. Meist benutzen wir für die Übertragung aus Alkohol in Paraffin Chloroform, das sich vortrefflich bewährt hat. Man bringt das Objekt zwei Tage in ein Gemisch von Alkohol abs. und Chloroform zu gleichen Teilen. Das Objekt, das zunächst auf dem Alkohol-Chloroform schwimmt, muß darin untersinken. Unter Umständen kann es lange dauern, bis dies geschieht. Aber dann erst und nie früher darf die Übertragung in reines Chloroform stattfinden. In diesem müssen die Objekte unbedingt zwei Tage verbleiben. Sind sie in den zwei Tagen nicht untergesunken, so hilft man nach, indem man zwei erbsengroße Stücke Paraffin in das Gefäß wirft und dieses auf 2—3 Stunden auf den Wärmeschrank stellt, wo die Objekte alsbald untersinken. Jetzt schüttet man die Flüssigkeit mitsamt den Objekten in vorher angewärmte Porzellannäpfe und gießt soviel davon ab, daß nur $^1/_3$ des Napfes mit Chloroform gefüllt ist. Zu diesem gibt man klein geschnittenes Paraffin bis nahezu an den Rand, und zwar für Antheren, Fruchtknoten und Wurzelspitzen solches von 52^0 Schmelzpunkt. Dann stellt man die Näpfe mit Inhalt in den Wärmeschrank.

Es ist zu empfehlen, in das Näpfchen gleich ein kleines Etikettchen mit der näheren Bezeichnung des Objektes einzulegen (Bleistiftschrift). Das hat zwei Vorteile: erstens verliert man den Namen des Objektes

nicht, und zweitens dient die Etikette zum Umrühren, indem man sie jeden Tag 1—2mal mit der Pinzette faßt und in der Flüssigkeit hin und herbewegt; dadurch wird die Verdunstung des Chloroforms befördert. Hat man das Umrühren jeden Tag sorgfältig ausgeführt, so ist in 3—4 Tagen kein Chloroform mehr vorhanden. Man läßt dann zur Vorsicht die Objekte noch 1—2 Tage im Wärmeschrank stehen, der stets auf 54—56° erwärmt sein muß. Jetzt kann man einbetten.

Empfehlenswert ist auch die ebenfalls im Bonner Institut ausgeübte Methode des Durchtränkens mit Hilfe von Benzol. Man bringt die Objekte nacheinander je einen Tag in

1. Benzol 1 Teil + Alkohol 2 Teile,
2. Benzol 2 Teile + Alkohol 1 Teil
3. reines Benzol.

Dann ersetzt man das Benzol durch neues und schneidet kleine Paraffinstückchen hinein, die man bei Zimmertemperatur sich lösen läßt. Hierauf bringt man die Objekte mit der Paraffinlösung in die bereits erwähnten Näpfe, schüttet soviel ab, daß sie nur auf $^1/_3$ ihres Volumens gefüllt sind und schneidet, wie oben, bis zum Rande Paraffin hinzu. Im übrigen verfährt man wie bei Chloroform.

Die Durchtränkung mittels Zedernholzöl ist ebenfalls sehr gut und dabei einfach. Man benutzt dazu das eingedickte, für die Beobachtung mit Immersion verwandte, nicht das gewöhnliche zur Aufhellung bestimmte Zedernöl (Verfahren von Juel). Die Objekte gelangen in folgende Flüssigkeiten:

1. abs. Alkohol 1 Teil + Zedernöl 1 Teil auf 2 Stunden,
2. abs. Alkohol 1 Teil + Zedernöl 3 Teile auf 2 Stunden,
3. gebrauchtes Zedernöl 1 Tag,
4. reines Zedernöl 1 Tag.

Gebrauchtes Zedernöl ist solches, das schon vorher als reines (unter 4) gedient hat; es kann längere Zeit benutzt werden. Von dem reinen Öl nimmt man nur eine geringe Menge. Aus dem Zedernöl überträgt man die Objekte direkt in verflüssigtes Paraffin von 52° Schmelzpunkt und stellt sie im Porzellannäpfchen in den Wärmeschrank. Das Paraffin ist vor dem Einbetten noch einmal zu wechseln.

Wie schon bemerkt, verwendet man gewöhnlich (für Antheren, Fruchtknoten, Wurzelspitzen) Paraffin vom Schmelzpunkt 52°. Früher durchtränkte man erst mit Paraffin vom Schmelzpunkt 45°, dann erst mit solchem vom Schmelzpunkt 52°. Nach unseren Erfahrungen ist dieser Umweg nicht nötig; wohl aber muß man bei härteren Objekten, z. B. Stengeln, Blättern oder verholzten Pflanzenteilen Paraffin von höherem Schmelzpunkt anwenden. Man verwendet je nach der Härte des Objektes solches von 56, 58, 60, 65, 72° C Schmelzpunkt, das man z. B. von Grübler & Co., Leipzig, beziehen kann. Bei der Überführung in Paraffin nimmt man bei diesen Objekten ebenfalls Zedernöl, verwendet es aber etwas anders. Zur Anwendung gelangt hier nämlich nicht das eingedickte, für die homogene Immersion benutzte, sondern das gewöhnliche zum Aufhellen dienende Zedernholzöl. Das Objekt kommt aus Alkohol in ein Gemisch von halb Alkohol und halb Zedernöl, in dem es zwei Tage bleiben soll, dann auf zwei Tage in Zedernholzöl. Man kann darin das Objekt ohne Schaden je nach der Härte wochenlang, sogar monatelang liegen lassen. Diese Übertragung hat zugleich den Vorzug, das Objekt aufzuhellen und geschmeidig zu machen. Zur Weiterbeförderung schüttet man das Objekt mit dem Zedernholzöl in ein angewärmtes Porzellannäpfchen und gibt soviel geschnittenes Paraffin zu, wie Zedernholzöl vor-

handen ist. Das Näpfchen bringt man in den Wärmeschrank, dessen Temperatur 2—3 Grad höher sein muß, als der Schmelzpunkt des Paraffins liegt. Man rührt wieder, wie oben angegeben, jeden Tag 1—2mal mit dem Etikettchen um, damit das Zedernöl sich schneller mit Paraffin mischt und das Paraffin leichter eindringt. Nach 3—4 Tagen gießt man die Flüssigkeit ab und ersetzt sie durch reines flüssiges Paraffin. Es empfiehlt sich, stets Paraffin in einem größeren Gefäß im Wärmeschrank bereit zu halten, damit es jederzeit flüssig zur Verfügung steht. Hat das Objekt jetzt noch zwei Tage in reinem Paraffin gelegen, so kann man es einbetten.

Manche Botaniker empfehlen auch, die Übertragung aus dem Alkohol in Paraffin durch Vermittlung von Bergamottöl zu vollziehen. Aus dem wasserfreien Alkohol kommt das Objekt in ein Gemisch von Alkohol und Bergamottöl zu gleichen Teilen auf zwei Tage, dann in reines Bergamottöl auf zwei Tage usw., genau wie zuletzt für Zedernöl angegeben wurde.

Man sorge dafür, daß der zuletzt angewandte Alkohol wirklich wasserfrei ist (vgl. S. 11). —

Führt man die Objekte zu schnell oder nicht wie angegeben durch die Alkohole und Chloroform (oder Benzol usw.), so geschieht es oft, daß sie im Wärmeschrank, statt auf dem Boden zu liegen, auf dem Paraffin schwimmen. Diese Objekte lassen sich später schlecht weiter verarbeiten. Erstens wird man keine guten Schnittbänder erhalten, und zweitens werden die Schnitte sich nicht gut färben lassen, oft sogar geschrumpft erscheinen. Bei sehr zarten Objekten sei man besonders vorsichtig. Man stelle also, wenn nötig, lieber noch einige Zwischenstufen zwischen Alkohol einerseits und Chloroform, Benzol, Zedernholzöl und Bergamottöl andererseits ein. So kann

man in diesen Fällen folgende Gemische nacheinander benutzen:

1. reinen Alkohol;
2. 3 Teile Alkohol, 1 Teil Chloroform;
3. 2 Teile Alkohol, 2 Teile Chloroform;
4. 1 Teil Alkohol, 3 Teile Chloroform;
5. reines Chloroform.

Ähnlich wird man bei Benzol, Zedernholzöl und Bergamottöl verfahren. —

Nur beiläufig will ich hier noch die Zelloidineinbettung erwähnen. Da sie viel umständlicher als die Paraffineinbettung ist, nicht so dünne Schnitte zu machen erlaubt und sich überhaupt für Pflanzen wegen deren Zellwände, die die dicken Zelloidinlösungen nur sehr langsam eindringen lassen, nicht sonderlich eignet, so sei von einer näheren Darstellung der Methode, die man in Lehrbüchern der zoologischen Technik (Lee-Mayer, Schuberg, Böhm-Oppel usw.) nachlesen mag, hier abgesehen. —

Notwendig ist es hingegen, dem in diesem Kapitel mehrfach erwähnten Wärmeschrank oder Thermostaten einige Worte zu widmen. Man kann diesen Apparat in den verschiedensten Formen bei vielen Firmen[1]) beziehen. Wir benutzen im Bonner botanischen Institut eine einfache Form (Fig. 3). Sie stellt einen ungefähr würfelförmigen Kasten dar, der aus Kupferblech mit doppelten Wänden gearbeitet und mit Ösen zum Aufhängen versehen ist. Der Raum zwischen den Wänden wird mit Wasser angefüllt. Auf der Oberseite des Kastens befinden sich drei Öffnungen. Zwei sind dazu bestimmt, Thermometer aufzunehmen. Es genügt, nur in die äußere von beiden

---

[1]) Z. B. Leitz-Wetzlar, R. Jung-Heidelberg, Altmann-Berlin, Hugershoff-Leipzig, Sartorius-Göttingen, Reichert-Wien u. a.

ein solches hineinzustecken, so daß es in das im Zwischenraum befindliche Wasser eintaucht und somit seine Temperatur stets anzeigt.

In die dritte wird ein Thermoregulator eingeführt, der den Gaszufluß so zu regeln erlaubt, daß innerhalb des Wärmeschranks eine konstante Temperatur herrscht. Es befinden sich mehrere Modelle von Thermoregulatoren im Handel, auf deren Beschreibung ich nicht eingehe. Wir benutzten früher einen einfachen Thermoregulator nach Reichert (von Jung - Heidelberg, Fig. 4). Das Gas strömt bei *B* zu und normalerweise durch das Röhrchen *A* und das Rohr *C* zum Brenner. Steigt die Temperatur, so dehnt sich das Quecksilber im Rohr *D* aus und schließt das Röhrchen *A*. Dadurch wird der Gaszufluß gehemmt. Damit aber die Flamme nicht ganz erlischt, ist eine kleine Öffnung *E* gelassen, die immer ein wenig Gas zum Brenner austreten läßt.

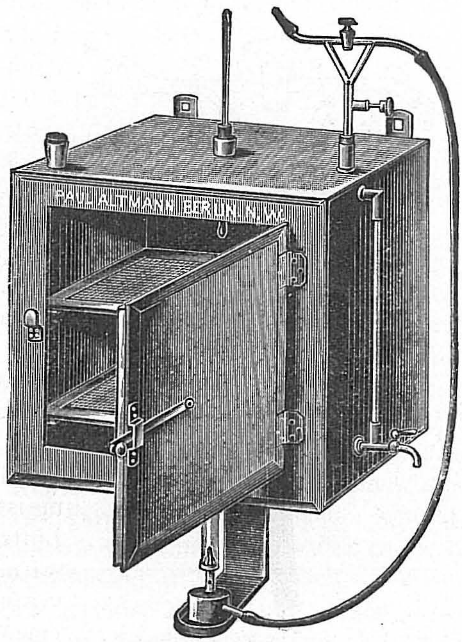


Fig. 3. Wärmeschrank.

Wenn man einen Thermostaten mit dem beschriebenen Regulator in Gang setzen will, verfährt man in der Weise, daß man ihn anheizt, bis die Temperatur den gewünschten Grad erreicht hat; dann schraubt man die Schraube *S* so tief hinein, daß das Quecksilber gerade bei *a* die innere Röhre berührt. Sinkt dann die Temperatur, so fällt die Quecksilbersäule, öffnet den Zugang zu dem Röhrchen *C* und läßt die Flamme größer werden, sodaß die Temperatur wieder steigt.

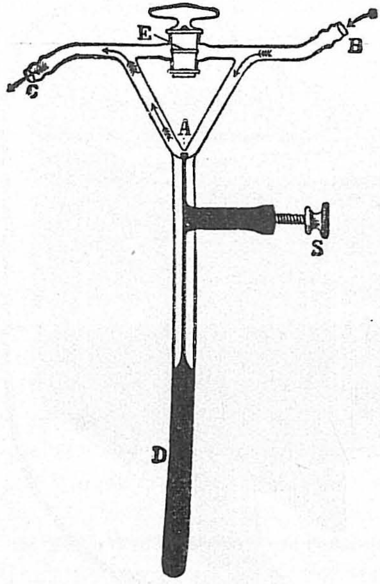


Fig. 4. Thermoregulator.

Zum Heizen des Wärmeschranks dient ein Mikrobrenner, d. h. ein Gasbrenner, dessen Flamme sehr klein gestellt werden kann, ohne zu erlöschen. Die Flamme ist zum Schutz gegen Luftzug, der ihre Nutzwärme für den Schrank verändern könnte, von einem Glimmerzylinderchen umgeben. Im Inneren des Schrankes befinden sich drei Fächer mit wagerecht angebrachten, zur Herbeiführung einer gleichmäßigen Wärmeverteilung mit Löchern versehenen Böden. Sie nehmen die Porzellannäpfe auf. — Man glaube übrigens nicht, daß der Thermoregulator an dem Apparat unentbehrlich ist. In Instituten, deren Arbeitsräume ohnehin eine ziemlich gleichmäßige Temperatur aufweisen, ist er

nicht nötig, da die Temperatur auch ohne ihn nur innerhalb enger Grenzen schwankt. Im Bonner Institut sind für die hier geschilderten Arbeiten seit Jahren keine Thermoregulatoren mehr verwendet worden.

Kapitel VI.

Das Einbetten in Paraffin.

Hat man die Objekte, wie im vorigen Kapitel auseinandergesetzt wurde, mit Paraffin durchtränkt, so wird das eigentliche Einbetten vorgenommen.

Als Gefäße zum Einbetten bedient man sich viereckiger Porzellanschälchen von 5 cm Länge, 4 cm Breite und 1 cm Höhe. (Zu beziehen bei der Firma Gerhard, Bonn, Bornheimerstraße.) Ihre Wände sind nach unten etwas zugeschrägt, damit die Paraffinplatte nach dem Erkalten sich leichter herauslöst. Aus demselben Grunde sind alle scharfen Kanten vermieden. Dies allein würde aber das Loslösen des Paraffins nicht genügend sichern. Daher bestreicht man vor dem Einbetten so viele Einbettschälchen, als man benutzen will, innen mit Glyzerin. Dieses bewahrt man in einer Flasche auf, deren Glasstöpsel nach unten in eine Spitze ausgezogen ist. Man trägt mit dem Glasstöpsel einen Tropfen Glyzerin innen auf und verreibt ihn gründlich mit dem Zeigefinger, so daß überall, auch in den Ecken, eine dünne Glyzerinschicht das Porzellan bedeckt. Es hat durchaus keinen Zweck, viel Glyzerin zu nehmen; dadurch wird das Ablösen des Paraffins nicht gefördert.

Außerdem stellt man sich eine große Schale mit kaltem Wasser zurecht. Während man die Einbette-

schälchen in dieser Weise vorbereitet, schmilzt man soviel Paraffin vom Schmelzpunkt desjenigen, in dem die Objekte

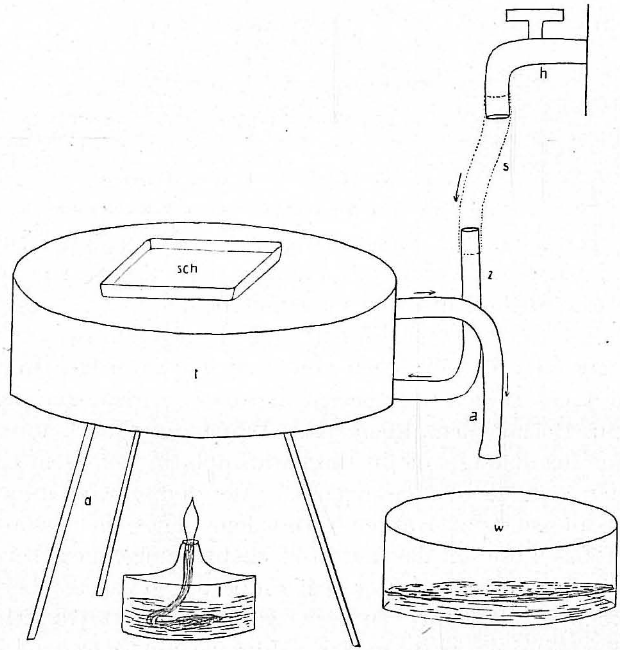


Fig. 5. Montierung der Einbettetrommel zum Gebrauch.
h Wasserhahn. *s* Gummischlauch. *z* Zulaufrohr. *t* Einbettetrommel. *sch* Einbettschälchen. *l* Spiritusflamme. *d* Dreifuß. *a* Ablaufrohr. *w* Wassergefäß.

sich im Wärmeschrank befanden, als zur Füllung der vorbereiteten Einbetteschälchen erforderlich ist. Zu gleicher Zeit wärmt man die „Einbettetrommel" vor.[1])

[1]) Nach meinen Angaben von Gummersbach, Bonn-Poppelsdorf, Klemens-Auguststr., angefertigt und zum Preise von 6 Mark zu beziehen.

Diese ist aus Kupferblech angefertigt und hat, wie der Name sagt, die Gestalt einer Trommel (vgl. Fig. 5). In diese mündet oben und unten je ein Rohr; beide sind bis über die obere bzw. untere Fläche der Trommel gebogen. Das eine dient dem Zufluß von Wasser und wird daher bei der Benutzung des Apparates mit dem Hahn einer Wasserleitung verbunden. Der Apparat erhält seinen Platz auf einem Dreifuß, unter dem eine Spiritusflamme zum Anheizen Platz findet. Unter die Mündung des zweiten Rohres bringt man ein Gefäß zur Aufnahme des abfließenden Wassers. Dann füllt man die Trommel, heizt sie auf etwa 60°, stellt ein Einbetteschälchen darauf und holt aus dem Wärmeschrank das Näpfchen mit den Objekten.

Mit dem bereitgehaltenen flüssigen Paraffin füllt man das Schälchen bis nahezu an den Rand. Dann holt man die Objekte einzeln mit der Pinzette aus dem Paraffin, in dem sie imprägniert worden sind, um sie in dem neuen Paraffinbade gleich entsprechend anzuordnen. Sind die Objekte so klein, daß man sie nicht mit der Pinzette fassen kann, so nimmt man das Paraffintöpfchen, schüttet das in ihm enthaltene Paraffin samt Objekten in das Einbettungsschälchen aus und orientiert dann in ihm die Objekte. Sie werden mit einer angewärmten Pinzette mit Abstand in Reihen geordnet, damit man sie später besser einzeln herausschneiden kann. Ist man mit dem Orientieren fertig, so daß die Objekte nach Wunsch liegen, so nimmt man die Spiritusflamme unter der Einbettetrommel fort und dreht langsam den Wasserhahn auf. Das hinzulaufende kalte Wasser verdrängt jetzt das warme, und die Trommel wird langsam erkalten. Der Boden des Schälchens erkaltet zuerst, und das Paraffin erstarrt. Infolgedessen können die Objekte sich nicht mehr

von der Stelle bewegen. Das Etikettchen mit dem Namen des Objektes, der Angabe über Fixierungszeit und -art bringt man zweckmäßig in einer Ecke oben auf dem Paraffin an, wo es die weiteren Manipulationen durchaus nicht stört.

Hat man eine solche Einbettetrommel nicht zur Verfügung, so verfährt man im wesentlichen in der geschilderten Weise; nur muß man das Einbetteschälchen vorher stark anwärmen und sich trotzdem mit dem Einbringen und Ordnen der Objekte sehr beeilen, weil das Paraffin sofort zu erkalten beginnt. Man kann sich unter Umständen helfen, indem man das Schälchen auf eine von unten durch eine Spiritusflamme erwärmte Metallplatte stellt. Es muß dann aber zum Erkalten abgehoben werden, und dabei ist Vorsicht vonnöten, damit die Objekte im Paraffin nicht wieder in Unordnung geraten.

Man bläst nun so lange vorsichtig über die Oberfläche des Paraffins, bis sich auf ihm eine feste Haut gebildet hat. Wenn diese so stark geworden ist, daß sie das Eindringen des Wassers verhindern kann, überträgt man das Schälchen von der Trommel in die daneben stehende Schale mit kaltem Wasser, die man unter die Wasserleitung bringt. Je kälter das Wasser, desto rascher erstarrt das Paraffin. Es löst sich infolge seines geringeren spezifischen Gewichtes aus dem Schälchen los und steigt an die Oberfläche des Wassers. Sollte es indessen nach etwa 10 Minuten noch festsitzen, so fährt man mit einem Messer an der schmalen Seite des Schälchens zwischen Paraffin und Wand entlang, wodurch das Täfelchen herausgedrückt wird. Die aus der Schale befreiten Paraffintafeln läßt man einige Minuten in dem fließenden Wasser schwimmen, nimmt sie dann heraus und trocknet sie ab.

Die Täfelchen hebt man nun bis zur weiteren Ver-

arbeitung der Objekte auf. Arbeitet man mit zahlreichen Objekten, so bedient man sich dabei aus Gründen der Ordnung mit Vorteil einer besonders gebauten Aufbewahrungsmappe. Dieselbe besteht aus einem Pappkarton, welcher in seinem Inneren durch Längs- und Querwände in Kammern von der Größe der Paraffintäfelchen geteilt wird (Fig. 6). Jeder Buchbinder stellt solche Mappen nach Angabe her.

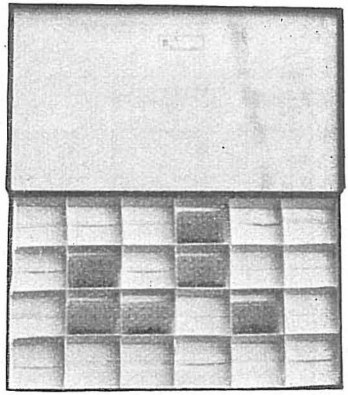


Fig. 6. Aufbewahrungsmappe für Paraffintafeln mit Objekten.

Im Anschluß an das Einbetten wollen wir sogleich noch besprechen, wie die eingebetteten Objekte isoliert und auf den Klötzchen befestigt werden, welche später in den Objekthalter des Mikrotoms geklemmt werden sollen. Zuvor überzeuge man sich, ob die Paraffinplatte wirklich gut ist, d. h. ob sie keine weißen, trüben Stellen oder gar Blasen und Löcher aufweist. Sollte das der Fall sein, so zerbreche man sie in mehrere Stücke, natürlich mit genügender Rücksicht auf die Objekte, und bringe das Ganze wieder in ein Näpfchen zurück, das in den Wärmeschrank gestellt wird. Ein Versuch, sie zu schneiden, wäre doch meist erfolglos.

Fig. 7 gibt eine schematisierte Aufsicht auf ein Paraffintäfelchen mit den darinliegenden Objekten. Wir ziehen nun, um die Objekte von einander zu trennen, in der Richtung *a b* mit dem Messer eine nicht zu tiefe

Furche, die es gestattet, das Täfelchen in zwei Hälften auseinander zu brechen; der Bruch folgt stets der eingerissenen Furche. Ritzt und bricht man dann ebenso in der Richtung *c d*, so erhält man die einzelnen Objekte in Paraffinprismen isoliert. Nun kann das Aufkleben auf die Holzklötzchen beginnen.

Diese Holzklötzchen haben eine prismatische Form, und müssen so zugeschnitten sein, daß sie in die Klammer

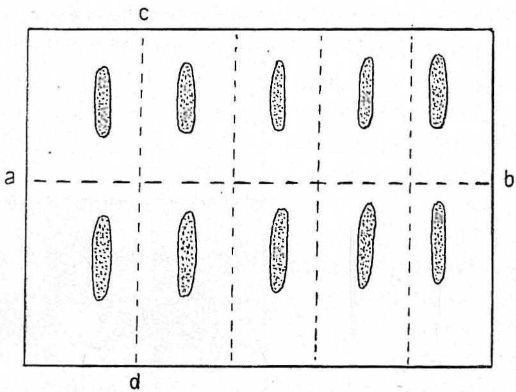


Fig. 7. Schema für die Schnittrichtung bei der Isolierung der eingebetteten Objekte.

des später zu beschreibenden Mikrotoms gut hineinpassen (Fig. 8). Nahe an einer ihrer kleinen Flächen tragen sie einen Bleieinsatz, der hinsichtlich seiner Schwere so bemessen ist, daß die Klötzchen gerade noch auf dem Wasser schwimmen und nicht untergehen.[1]) Auf der Fläche oberhalb des Bleieinsatzes wird das Objekt mit seinem Paraffinprisma befestigt.

---

[1]) Klötzchen dieser Art liefert nach meinen Angaben Heinrichs, Bonn-Poppelsdorf, Burggraben.

Damit man mit der richtigen Einstellung des Objekts auf dem Mikrotom später nicht so viel Arbeit hat, bringt man die Objekte auf dem Holzklötzchen möglichst schon jetzt entsprechend der Richtung an, in der man sie später zu schneiden gedenkt. Will man Längsschnittserien von dem Objekt gewinnen, so befestigt man das Paraffinstück, in dem es sich befindet, so auf dem Holzklötzchen, daß die Längsachse des Objekts später parallel zur Schneide des Messers gestellt werden kann. Sie muß also jetzt parallel zur oberen Fläche des Holzklötzchens liegen (vgl. Fig. 9). Hat man es dagegen auf Querschnitte abgesehen, so muß das Paraffinstück derart auf dem Holzklötzchen befestigt werden, daß die Längsachse des Objektes später senkrecht zur Messerschneide orientiert werden kann. Sie muß also auch jetzt senkrecht zur oberen Fläche des Holzklötzchens liegen (Fig. 10). Muß man die Objekte auf ein vorher noch nicht benutztes Holzklötzchen kleben, so bringt man auf die obere Fläche des Klötzchens etwas Paraffin, verflüssigt dieses mit einem über einer Flamme erhitzten Spatel und drückt das Paraffinstück mit dem Objekt so darauf, daß seine Kanten parallel zu denen des Holzklötzchens orientiert sind. Das Paraffinstück ist natürlich schon vorher viereckig zuzuschneiden. Auf der Oberfläche gebrauchter Klötzchen ist schon genügend Paraffin vorhanden, das man dann nur durch Berührung mit dem heißen Spatel zu verflüssigen braucht. Zur sichereren Befestigung fährt man dann noch mit dem heißen Spatel

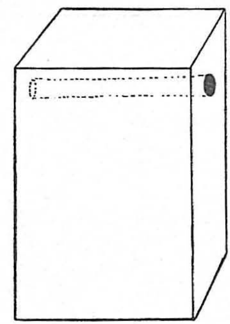


Fig. 8. Holzklötzchen zum Aufkleben der Paraffinstücke mit den Objekten. (Bleieinguß angedeutet.)

an den Wänden des Paraffinstückes entlang. Wenn das flüssige Paraffin anfängt fest zu werden, wirft man das Klötzchen mit dem daraufsitzenden Objekt in kaltes

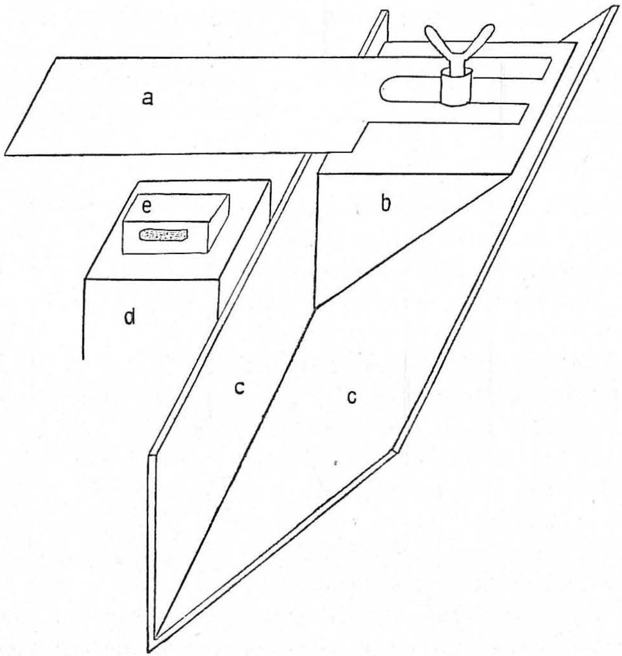


Fig. 9. Orientierung der Objekte für Längsschnitte.

a Messer. *b* Messerschlitten. *c* Messerschlittenbahn. *d* Holzklötzchen. *e* Paraffinstück mit Objekt.

Wasser. Der Vorteil des Bleieingusses zeigt sich jetzt in der Weise, daß die Seite des Holzklötzchens, an der er sich befindet, unter Wasser getaucht ist, so daß das an dieser Seite befestigte Objekt allseitig vom Wasser umspült wird.

Hat man eine Reihe von Objekten in der vorher beschriebenen Weise aufgeklebt, so bringt man das Gefäß mit Wasser, in dem sie sich befinden, unter die Wasser-

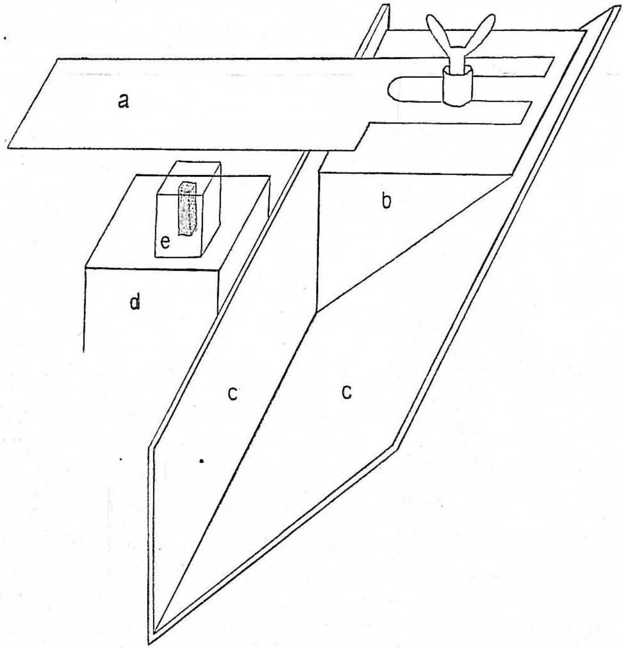


Fig. 10. Orientierung der Objekte für Querschnitte.

a Messer. *b* Messerschlitten. *c* Messerschlittenbahn. *d* Holzklötzchen. *e* Paraffinstück mit Objekt.

leitung und kühlt sie fünf Minuten mit fließendem Wasser, worauf das Schneiden beginnen kann.

Kapitel VII.

Einbettung sehr kleiner Objekte.

Hat man besonders kleine Objekte, die man mit bloßem Auge nicht oder kaum sieht (etwa niedere Algen, Peridineen usw.), zum Schneiden einzubetten, so verfährt man im Prinzip genau so, wie für größere Objekte angegeben wurde. Nur hat man darauf zu achten, daß man bei der Überführung in die verschiedenen Flüssigkeiten kein Material verliere. Man kann das auf verschiedene Weisen erreichen.

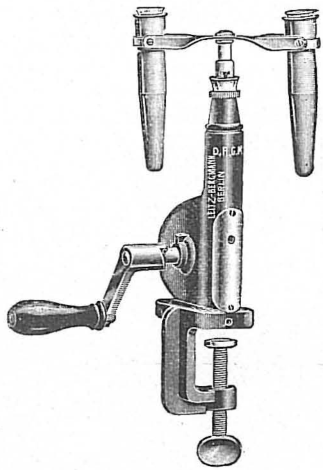


Fig. 11. Handzentrifuge nach Leitz.

1. Man bringt die Objekte in das Röhrchen einer kleinen Handzentrifuge (Fig. 11), zentrifugiert und schüttet jedesmal ab, wenn die betreffende Flüssigkeit lange genug eingewirkt hat und durch die folgende ersetzt werden soll. So gelangen die Objekte schließlich in Chloroform oder Benzol. Man kann nun nach Borgert die Einbettung folgendermaßen vornehmen: In einem sauberen Uhrgläschen läßt man ganz reines Paraffin erstarren, bohrt in der Mitte ein kleines Loch, bringt etwas von dem Material in Benzol usw. hinein und setzt das Uhrgläschen auf einige Zeit in den Wärmeschrank; dann bringt man es schnell in kaltes Wasser. Hat man sauber gearbeitet, so löst sich das Paraffin leicht vom Uhrglase ab. Das die Objekte enthaltende

Stück Paraffin in der Mitte wird nun herausgeschnitten und wie üblich weiterbehandelt.

2. Man bringt die Objekte von vornherein in eine unten mit feiner Leinwand oder Seidengaze verschlossene lange und ziemlich dünne Röhre. Zur Fixierung, Entwässerung usw. taucht man die Röhre auf die vorgeschriebene Zeit in die erforderlichen Flüssigkeiten. Hat man sie schließlich genügende Zeit in Paraffin gestellt, so schließt man sie oben mit dem Finger, zieht sie heraus und taucht sie nach kurzer Zeit in kaltes Wasser. Dann wird der Verschluß entfernt und der Paraffinkern durch leichtes allseitiges Erwärmen vom Glase losgelöst.

3. Das Material wird in ein enges, kleines Reagenzgläschen gebracht, das man oben gut mit Glaswolle oder auch mit Watte verschließt; oder man verwendet ein an beiden Seiten zugestopftes Röhrchen. Dieses Gläschen behandelt man dann ganz wie ein großes Objekt, bringt es also durch die verschiedenen Alkoholstufen und Chloroform in Paraffin. Ist dieses zum Erstarren gebracht, so zerschlägt man das Gläschen vorsichtig und entfernt alle Glasteilchen von dem Paraffinkern, oder man löst diesen, wie oben angegeben, durch sanftes Erwärmen von außen.

Möchte man die Objekte während des Einbettens und im Paraffin sehen, so kann man dem absoluten Alkohol, den sie passieren müssen, etwas Eosin zusetzen, so daß sie rot gefärbt werden. Aus den Schnitten wäscht man die Farbe nachher wieder aus.

Kapitel VIII.

Das Mikrotom.

Seit der Einführung der Mikrotome ist eine ganze Reihe von Modellen dieser Instrumente, die auch dem Un-

geschickten die Herstellung der feinsten Schnitte ermöglichen, in den Handel gekommen. Der Hauptunterschied der verschiedenen Konstruktionen ist der, daß bei der einen Art von Mikrotomen sich das Messer gegen das Objekt bewegt, während bei der anderen das Objekt gegen das feststehende Messer geführt wird.[1]) Zu der ersten Gruppe gehören z. B. die Schlittenmikrotome von Jung-Heidelberg, Bausch und Lomb, Becker-Göttingen, Reichert-Wien, Leitz-Wetzlar u. a. Bei fast allen wirkt die das Objekt hebende Mikrometerschraube senkrecht, nur bei den meisten Jungschen Konstruktionen, von welchen später die Rede sein wird, ist die Objektführung anders. Zu den Mikrotomen mit feststehendem Messer gehört vor allem das Minotsche, das z. B. von allen eben genannten Firmen geliefert wird.

Diese Anführung soll nicht mit irgendwelchen Werturteilen verbunden werden; zweifellos leisten alle genannten und auch die hier nicht genannten Firmen Vortreffliches, und jeder wird schließlich mit dem Fabrikat am besten arbeiten, an das er gewöhnt ist.

Wir benutzen im Bonner botanischen Institut ein Schlittenmikrotom von Jung und ein Minotsches Mikrotom von Bausch und Lomb. Letzteres dient hauptsächlich dazu, schnell und sicher lange Schnittserien anzufertigen. Das Jungsche Mikrotom (Fig. 12) arbeitet nicht so schnell, aber sehr gut. Für kleine Objekte, von denen sich nur einige Schnitte gewinnen lassen, ziehen wir es dem Minotschen vor. Die folgende Beschreibung

---

[1]) Über Mikrotome verschiedener Art berichtet die Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, herausgegeben von Küster; weiterhin vergleiche man die Kataloge der oben genannten Mikrotomfabriken und die Übersicht von Moll im Progr. rei bot., Bd. II, 1907.

wird sich auf dieses von uns am meisten gebrauchte Instrument beschränken.

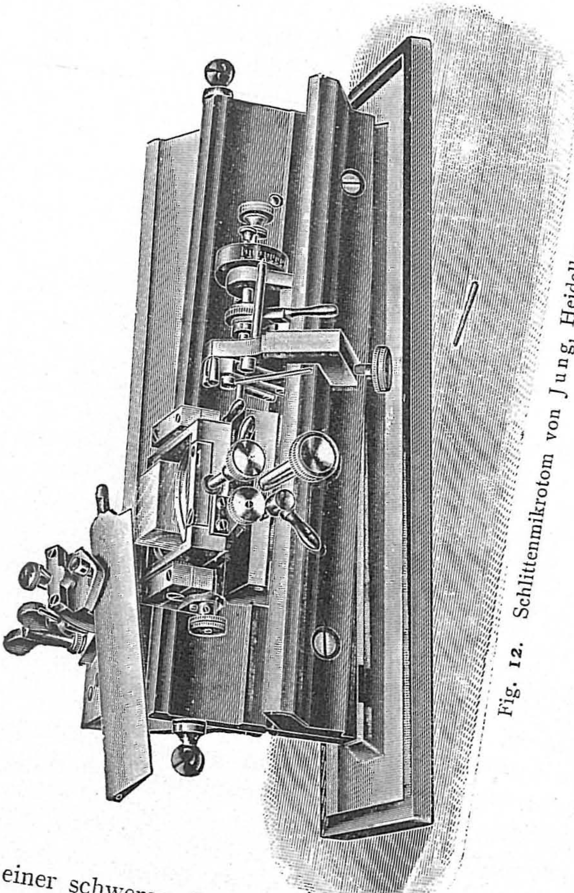


Fig. 12. Schlittenmikrotom von Jung, Heidelberg.

Auf einer schweren Grundplatte steht senkrecht zu ihr eine andere Metallplatte, an die sich zwei weitere

rechts und links im spitzen Winkel ansetzen. Die eine der so gebildeten Rinnen verläuft wagerecht, die andere steigt allmählich an. In diese wird ein Keil, der Objektschlitten (Fig. 13), eingesetzt, der den Objekthalter trägt. Dieser besteht im wesentlichen aus einem Rahmen, in dem durch Schrauben die schon im vorigen Abschnitt erwähnten Holzklötzchen mit den Paraffinblöcken befestigt werden können. Die komplizierteren

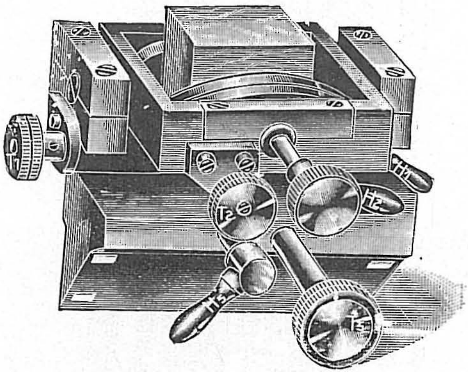


Fig. 13. Objektschlitten.

Objekthalter sind mit Vorrichtungen versehen, die eine Orientierung des Objekts in jeder gewünschten Lage gestatten, welche dann durch Stellschrauben fixiert wird. In demselben Winkel, also in der Bahn des Objektschlittens, wird, vom Arbeitsplatz aus gesehen vor dem Objektschlitten, der Mikrometerschraubenschlitten (Fig. 14) festgeschraubt, und zwar so, daß die Spitze der Mikrometerschraube gerade den Objektschlitten berührt. Die Mikrometerschraube, mittels der das Objekt gehoben wird, ist mit einer Vorrichtung, die aus einer festen und einer beweg-

lichen Kreisschraube mit Skala besteht, verbunden, an der man ablesen kann, wieviel das Objekt nach einer bestimmten Drehung gehoben worden ist. Am gebräuchlichsten sind solche Mikrometerschlitten, an welchen diese Vorrichtung mit Anschlag versehen ist. Alsdann braucht man nur auf eine bestimmte Schnittdicke vor dem Schneiden einzustellen. Dreht man jetzt die Schraube, so tritt eine Einschnappvorrichtung in Tätigkeit, wenn das Objekt um

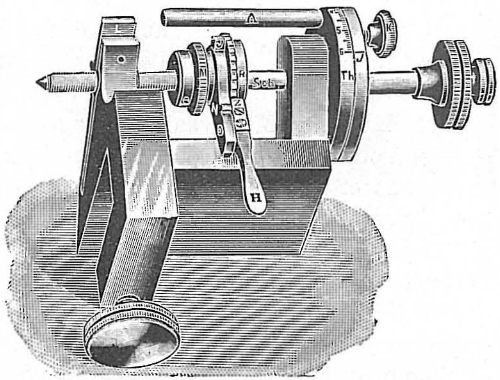


Fig. 14. Mikrometerschraubenschlitten.

den gewünschten Betrag gehoben ist. Es ist klar, daß dadurch ein beinahe mechanisches und sehr schnelles Arbeiten gewährleistet wird.

In dem Winkel auf der anderen Seite der senkrecht stehenden Platte liegt die (wagerechte) Bahn des ebenfalls keilförmigen Messerschlittens. Derselbe läuft nicht auf seiner ganzen Fläche, sondern, um die Reibung herabzusetzen, auf einigen Elfenbeinfüßchen. Doch hat man, wie hier bereits bemerkt sei, jedesmal vor dem Schneiden die Messerbahn mit absolut säurefreiem Knochenöl zu

bepinseln. Oben trägt der Messerschlitten einen starken Stift mit einer Flügelschraube. Hier wird das Messer befestigt.

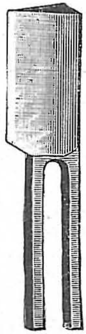


Fig. 15. Messer nach Henking.

Die älteren Messer nach Henking (Fig. 15), Weigert oder Thoma werden direkt auf dem Messerschlitten befestigt, indem man den Einschnitt ihres Griffes über den Stift schiebt und die Flügelschraube andreht. Neuerdings kommen immer mehr solche Messer, z. B. die von Jung oder Loew (Fig. 16) auf, welche in einem Messerhalter (Fig. 17) befestigt werden, den man vorher wie die älteren Messer dem Schlitten aufsetzt. Die Messerhalter bringen vor allem den Vorteil mit sich, daß bei ihrer Anwendung die ganze Schneide des Messers ausgenutzt werden kann. Wir beziehen sie von Jung (Heidelberg). Die Mikrotommesser sind gewöhnlich plankonkav oder beiderseits konkav geschliffen. Messer, die beiderseits plan geschliffen sind, finden nur Verwendung bei sehr harten oder gefrorenen Objekten, kommen also für cytologische Studien kaum in Betracht. Man wende der Pflege des Messers die größte Sorgfalt zu, denn selbst das beste Mikrotom



Fig. 16. Messer nach Loew.

wird mit ungepflegten Messern keine guten Resultate zeitigen können. Sind sie nicht mehr recht scharf, so sende man sie der Bezugsfirma zum Schleifen ein. Nur die

wenigsten[1]) werden geschickt genug sein, das Schleifen selbst auszuführen. Nach jedem Gebrauch sind die Messer, wie übrigens das ganze Mikrotom, sorgfältig zu reinigen und im Etui aufzubewahren.

Das Prinzip des Schneidens ist folgendes: Angenommen, das obere Ende des Paraffinstücks rage gerade bis zur Messerhöhe empor. Dreht man nun so an der Mikrometerschraube, daß diese sich von dem Arbeitenden fortbewegt, so wird dadurch auch der Objektschlitten, den die Schraube ja berührt, fortgedrückt. Da aber seine Bahn etwas ansteigt, wird er, und mit ihm das Objekt, sich gleichzeitig etwas heben. Bewegt man nun das Messer von hinten nach vorn durch seine Bahn, so wird es soviel von dem Paraffin bzw. dem Objekt abtragen, als letzteres gehoben worden ist. Schiebt man jetzt das Messer wieder bis hinter das Objekt zurück, dreht wieder die Mikrometerschraube und zieht das Messer wieder nach vorn, so wird ein neuer Schnitt durch Paraffin und Objekt entstehen. Durch fortgesetzte Wiederholung dieser Manipulationen, deren genauere Beschreibung dem nächsten Abschnitt vorbehalten ist, gewinnt man eine lückenlose Reihe von Schnitten, deren Dicke, wie oben angegeben, durch die Vorrichtung an der Mikrometerschraube von vornherein festgelegt werden kann.

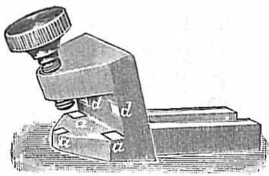


Fig. 17. Messerhalter.

[1]) Für sie sei auf die Vorschriften von Moll (Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. IX 1892, S. 457) hingewiesen.

Kapitel IX.

Die Herstellung der Schnitte.

Will man das Schneiden eines Objekts beginnen, so stellt man sich auf dem Tisch, der das Mikrotom trägt, folgende Gegenstände zurecht: das Gefäß, in dem das Holzklötzchen mit dem aufgeklebten Objekt (vgl. S. 36, 37) schwimmt, das Messeretui, ein scharfes, dünnes Skalpell, einen feinen weichen Pinsel, ein Blatt (am besten schwarzen) Papiers oder Kartons; ferner eine genügende Anzahl von Objektträgern, ein Fläschchen mit röhrenartigem durch eine Gummikappe oben geschlossenen Glasstöpsel, das mit destilliertem Wasser gefüllt ist, ein Fläschchen von der oben für die Glyzerinaufbewahrung angegebenen Art, gefüllt mit Eiweißglyzerin und eine Spiritusflamme. Die letztgenannten Gegenstände dienen zum Aufkleben der Schnitte, das sich ihrer Herstellung sofort anschließt und im nächsten Kapitel besprochen werden wird. Man holt nun das Holzklötzchen aus dem Wasser hervor und trocknet es samt dem Paraffinblock mit einem Tuche sauber ab. Dann schiebt man das Holzklötzchen in den Rahmen des Objekthalters und befestigt es hier durch Anziehen der Schraube. Schon vorher hatten wir das Objekt nach Möglichkeit so auf dem Klötzchen angebracht, wie es Art und Richtung der Schnitte verlangen (siehe S. 36, 37). Jetzt bringen wir es durch Verstellen der Schrauben am Objekthalter endgültig in die gewünschte Lage zum Messer und fixieren es in ihr. Nunmehr befestigt man das Messer, direkt oder durch Vermittlung des Messerhalters, auf dem Messerschlitten, dessen Bahn wir dann ölen. — Während zoologische Objekte oft Schrägstellung des Messers verlangen, können alle

botanischen Objekte mit nur wenig Ausnahmen mit quergestelltem, also im rechten Winkel zur Bahn befestigtem Messer geschnitten werden. Das bringt den Vorteil mit sich, daß die Schnitte aneinander kleben bleiben und auf diese Weise Bänder bilden, die weit einfacher zu behandeln sind als Einzelschnitte.

Das Messer wird nun nahe an den Paraffinblock geführt. Dadurch wird es möglich, seine Kanten mit dem Skalpell so zuzuschneiden, daß sie genau parallel bzw. senkrecht zur Messerschneide stehen. Anderenfalls kann man nicht auf gute Schnittbänder rechnen. Natürlich hat man Acht darauf zu geben, daß man nicht das Objekt dabei verletzt. Nach dem Zurechtschneiden bringt man den Paraffinblock mittels der die vertikale Bewegung des Objekthalters bewirkenden Schraube in solche Höhe, daß das Messer ihn eben faßt. Durch langsames Höherdrehen und Überfahren mit dem Messer trägt man nun dünne Scheiben vom Paraffin ab, bis das Objekt beinahe erreicht ist, d. h. in Messerhöhe steht.

In dieser Stellung fixiert man den Objekthalter mittels des dafür vorhandenen Sperrhebels. Man versuche nicht, dicke Stücke vom Paraffin abzuschneiden, um schneller zum Ziel zu kommen: denn diese Behandlung könnte sowohl dem Messer als auch dem Objekt schaden.

Nun stellt man noch die Schnittdicke an der Kreisscheibe der Mikrometerschraube ein. Hierfür ist die Art und Beschaffenheit des Objekts bestimmend. Großkernige Objekte (Liliaceen, Ranunculaceen) schneidet man gewöhnlich $7^1/_2$—15 μ (1 μ = $^1/_{1000}$ mm) dick, kleinkernige evtl. dünner. Ältere Embryosäcke schneidet man zweckmäßig nicht unter 10—15 μ dick, weil man sonst richtige Vorstellungen vom Bau des Objekts nur durch

Kombination mehrerer Schnitte erhält, wodurch die Beobachtung unsicher wird.

Damit sind die Vorbereitungen zum Schneiden erledigt. Im wesentlichen müssen sie bei allen Mikrotomen prinzipiell in derselben Weise und Reihenfolge ausgeführt werden. Das Schneiden selbst geht folgendermaßen vor sich: Der Daumen der linken Hand, der dem Knopf der Mikrometerschraube anliegt, dreht diese, bis sie einschnappt. Dann zieht man den Messerschlitten mit einem Ruck über das Objekt hinweg. Die hierbei entstandene dünne Paraffinscheibe bleibt auf dem Messer liegen, wenn man dieses nunmehr wieder bis hinter das Objekt zurückschiebt. Nun dreht der Daumen die Mikrometerschraube wieder bis zum folgenden Anschlag, man zieht das Messer wieder nach vorn, wodurch der zweite Schnitt entsteht usw. Der Anfänger übt sich am besten im Drehen der Mikrometerschraube und der Führung des Messers an einem Paraffinblock ohne Objekt, damit er sich an das Drehen der Schraube gewöhnt und die Unsicherheit, die sich durch die verschiedene Betätigung der linken und rechten Hand ergibt, verliert. Vor allem lege er Wert auf gleichmäßige Messerführung. Man faßt den Messerschlitten an seiner vorderen und hinteren Fläche mit dem Daumen bzw. mit zwei Fingern und führt ihn so, ohne irgendwelchen Druck nach unten auszuüben, der sicher ungleiche Dicke der Schnitte veranlassen würde, mit gleichmäßiger Schnelligkeit nach vorn. Um jedes klappernde Geräusch, das sichere Anzeichen des unregelmäßigen Ganges des Messerschlittens in seiner Bahn, auszuschalten, empfiehlt es sich, das Messer nur soweit nach vorn und hinten zu bewegen, als eben nötig ist, um den Paraffinblock zu treffen und von Zeit zu Zeit die Reibungsflächen nachzuölen.

Die von jeder Führung des Messers hervorgerufenen Einzelschnitte kleben von selbst aneinander und bilden ein Band, das sich auf der Oberfläche des Messers bei der Zuführung eines jeden neuen Schnittes vorwärts schiebt und verlängert. Hat das Band eine genügende Länge erreicht, so daß es über den Messerrücken heruntergleitet, so schneidet man es mit dem Skalpell, nicht zu nahe an der Messerschneide, an der leicht kenntlichen Grenzlinie zwischen zwei Schnitten ab und überträgt es mit dem Skalpell oder einem angefeuchteten Pinsel auf das neben dem Mikrotom liegende Blatt schwarzen Papiers, wobei man sich angewöhne, die Schnittbänder in der Reihenfolge ihrer Entstehung anzuordnen, weil diese Anordnung für viele Untersuchungen auch späterhin noch unbedingt erhalten bleiben muß. Sollten die Schnittbänder nicht auf dem Messer weitergleiten, so kann man mit dem Skalpell oder Pinsel nachhelfen. Rollt sich das Band nach einer Seite ein, so ist der Grund hierfür darin zu suchen, daß die Kanten des Paraffinblocks nicht parallel, bzw. senkrecht zum Messer geschnitten sind, oder daß das Objekt nicht in der Mitte des Paraffinblocks liegt. Durch korrigierendes Zurechtschneiden des Paraffinblocks kann man den Übelstand abstellen. Wenn die Einzelschnitte sich umklappen oder nicht aneinanderkleben, dann ist das Paraffin entweder zu hart, oder die Schnitte sind zu dick, oder aber beides wirkt zusammen. Man beseitigt die unliebsame Erscheinung, indem man den Paraffinblock etwas anhaucht und durch Streichen des Messers mit Daumen und Zeigefinger dieses anwärmt. Eine weitere Störung beim Schneiden kann sich daraus ergeben, daß die Breite der Einzelschnitte im Verhältnis zur Breite des Paraffinblocks stark vermindert wird, wobei die Schnittbänder auch meist am Messer kleben.

Schuld daran ist die ungenügende Kühlung des Paraffinblocks bzw. des Messers oder zu hohe Zimmertemperatur. Dementsprechend schafft man Abhilfe durch nachträgliche Kühlung des Paraffinblocks und des Messers. Letzteres kühlt man an heißen Sommertagen auch während des Schneidens öfter mit Wasser.

Kapitel X.

Das Aufkleben der Schnitte.

Hat man in der angegebenen Weise das ganze Objekt in eine zusammenhängende lückenlose Serie von Schnitten zerlegt und diese auf verschiedene, genau geordnete Schnittbänder verteilt, so wird man sogleich mit dem Aufkleben der Schnitte auf die bereitgelegten Objektträger beginnen. Man überzeugt sich erst, ob diese auch völlig rein sind. Neubezogene Objektträger legt man erst einige Zeit in verdünnte Salzsäure, spült sie gründlich mit Wasser ab, bringt sie dann in 70—96proz. Alkohol und trocknet sie schließlich mit einem reinen Tuch, das keine Fasern abgibt. Deckgläser behandelt man ebenso, beläßt sie aber in Alkohol und trocknet immer nur soviele, als jeweils erforderlich sind. Gebrauchte Deckgläser und Objektträger, die noch durch Harz zusammengekittet sind, bringt man in senkrechter Stellung in Xylol. Das Harz löst sich, und die Deckgläschen gleiten von den Objektträgern herab. Man führt sie nun durch Alkohol in Wasser über, worauf sie abgerieben und wie neue Gläser behandelt werden.

Zum Aufkleben der Schnitte bedienen wir uns der Eiweiß-Glyzerin-Methode von P. Mayer. Die dazu notwendige Mischung stellt man sich folgendermaßen selbst

her: Man verrührt das Eiweiß eines Hühnereies mit der gleichen Raummenge reinen Glyzerins. Um es haltbar zu machen, fügt man ein erbsengroßes Stück Kampfer oder etwas Thymol zu. Zur Benutzung hebt man das

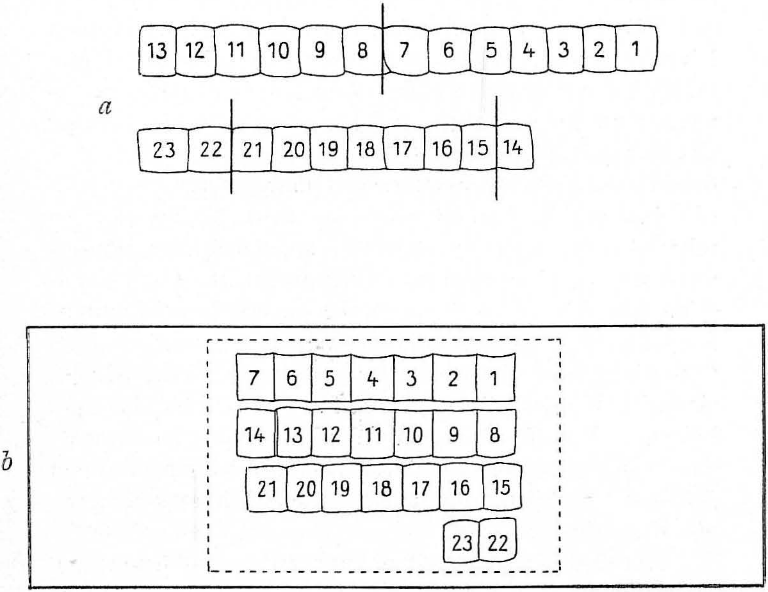


Fig. 18. Das Aufkleben der Schnitte.

a Das Schnittband, das an den durch senkrechte Linien markierten Stellen zerlegt wird. *b* Anordnung der Schnitte auf dem Objektträger. Das gestrichelte Rechteck gibt die Größe des Deckglases an.

Eiweiß-Glyzerin, wie bemerkt, in einer Flasche mit verlängertem Glasstöpsel auf.

Das erste ist nun, daß die Schnittbänder mit dem Skalpell in Teilbänder zerlegt werden, die etwas kürzer sein müssen als die längste Kante der Deckgläser, mit

welchen die Präparate nachher bedeckt werden sollen (Fig. 18a). Es empfiehlt sich, Deckgläser großen Formats zu verwenden (24×32 oder 25×45 mm), so daß ansehnlich lange Reihen auf den Präparaten gebildet werden können.

Mit einem Glasstab trägt man einen kleinen Tropfen Eiweiß-Glyzerin in der Mitte des Objektträgers auf und verreibt ihn tüchtig mit dem Zeigefinger, so daß das Eiweiß-Glyzerin auf dem Objektträger eine gleichmäßig dünne Schicht bildet. Man befeuchtet diese mit etwas destilliertem Wasser aus der Spritzflasche. Nun legt man die einzelnen Teilbänder, mit dem ersten beginnend, vermittelst des Skalpells oder des angefeuchteten Pinsels auf den Objektträger, so wie es Fig. 18b zeigt. Die Reihenfolge der Objektträger, wie sie der natürlichen Schichtenfolge des untersuchten Objektes entspricht, wird der Geübte oft an den Schnitten selbst erkennen. Sicherer ist es, sie auf den Objektträgern durch Zahlen zu vermerken, am besten mit Hilfe eines der üblichen Schreibdiamanten, da die mit Ölstiften aufgetragenen Bezeichnungen beim späteren Durchgang durch verschiedene Flüssigkeiten unleserlich werden.

Auf den angefeuchteten Objektträgern müssen sich die Schnitte ausbreiten und glätten. Tun sie dies nicht in genügendem Maße, so beträufelt man das Eiweiß-Glyzerin mit einer größeren Menge Wassers, bringt die Schnittbänder darauf und erwärmt den Objektträger vorsichtig über einer Spiritusflamme, bis die Bänder sich strecken. Doch soll hierbei das Paraffin sich nicht verflüssigen. Das überschüssige Wasser läßt man ablaufen, ohne daß dabei die Schnitte ins Rutschen kommen. Nach 2—3 Minuten bringt man die Objektträger in den Wärmeschrank und legt sie mit der Unterseite auf die darinstehenden

Paraffinnäpfe, nicht unmittelbar auf den Boden des Wärmeschranks. Dort müssen sie mindestens drei Stunden verbleiben.

Ein längeres Verweilen im Ofen, etwa über Nacht, wirkt nicht schädigend auf die Objekte ein, bringt sogar den Vorzug sehr sicheren Haftens der Schnitte. Hiernach legt man die Objektträger mit der Paraffinschicht nach oben auf den Tisch und läßt sie sich abkühlen, bis das Paraffin erstarrt ist. In diesem Zustand kann man die Präparate beliebig lange aufbewahren, falls man nicht vorzieht, sie sogleich in der nachfolgend beschriebenen Weise weiter zu behandeln.

Kapitel XI.

Befreien der Schnitte vom Paraffin.

Wir schicken diesem Abschnitt einige Angaben voraus über die Gefäße für die verschiedenen Flüssigkeiten (Reagentien, Farben), mit denen die Objekte von jetzt ab behandelt werden müssen. Zu empfehlen sind stets Zylindergläser von $10^1/_2$ cm Höhe und 5 cm Innendurchmesser mit eingeschliffenem Glasdeckel (von Vogel, Gießen). In diesen Gefäßen kann man je vier Objektträger gleichzeitig behandeln, indem man sie zu 2 und 2 mit den freien Seiten aufeinanderlegt und die Paare schräg hineinstellt, so daß ihre unteren Enden auf der Mitte des Bodens gegeneinander lehnen. Um das Zusammenklappen der Objektträgerpaare zu verhindern, lasse man ein sauberes Korkstückchen ein- für allemal in dem Gefäß schwimmen; beim Einstecken der Objektträgerpaare läßt man es zwischen diese gelangen. Es sind von manchen Seiten besondere Behälter zur gleichzeitigen Behandlung mehrerer Objektträger empfohlen

worden. Die oben beschriebenen haben aber vor allen diesen den großen Vorzug, daß man in ihnen die Objektträger hin- und herbewegen kann.

Um die Schnitte vom Paraffin zu befreien, stellt man die Objektträger einzeln oder paarweise in Xylol (oder Terpentinöl); in diesem läßt man sie einige Zeit stehen oder schwenkt sie noch besser hin und her. Nach einigen Minuten ist alles Paraffin aus den Schnitten entfernt. (Von Zeit zu Zeit ist natürlich das Xylol zu erneuern, wenn seine lösende Wirkung abnimmt.) Dann überträgt man die Objektträger in ein Gefäß mit absolutem Alkohol und behandelt sie in ihm ebenso. Ich pflege nach einigen Minuten die Objektträgerpaare aus dem Alkohol zu nehmen, die einzelnen Objektträger gegeneinander so zu verschieben, daß man sie mit der linken Hand wie Spielkarten fächerförmig nebeneinander halten kann und sie auf beiden Seiten mit 96proz. Alkohol mehrmals zu übergießen. Dann schiebt man die Objektträger wieder zusammen, stellt sie in ein Glas frischen Brunnenwassers und schwenkt sie ein paarmal hin und her.

Enthalten die Präparate Schnitte von Objekten, deren Fixierung in einer osmiumhaltigen Flüssigkeit erfolgt ist, so müssen die entstandenen Schwärzungen nunmehr beseitigt werden, da sie die spätere Färbung stören könnten. Die Objektträger mit den Schnitten werden zu diesem Zweck je nach der Art des vorliegenden Objektes 5 bis 12 Stunden in käufliches 3proz. Wasserstoffsuperoxyd gestellt. Ergibt die mikroskopische Kontrolle dann noch einen schwärzlichen Farbenton in den Schnitten, so wird die Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd fortgesetzt, bis die gewünschte Bleichung erreicht ist. Ist die Schwärzung, welche die Osmiumsäure den Präparaten mitgeteilt hat, auf das Vorhandensein von Fetten in den Schnitten zurück-

zuführen, so verdient die Anwendung von Terpentinöl den Vorzug. Dann werden die Präparate nach dem Abwaschen des Xylols mit 96proz. Alkohol durch weitere Behandlung mit absolutem Alkohol vollständig entwässert, in einem Gefäß mit Terpentinöl umgeschwenkt und 24—48 Stunden darin belassen. Das Terpentinöl wird dann durch Abspülen mit 96proz. Alkohol aus den Schnitten entfernt.

Welche von den beiden Methoden am besten zum Ziel führt, muß ausprobiert werden, da die eine für diese, die andere für jene Objekte sich besser eignet. Ebenso ist auch der Anwendungsbereich eines jeden der folgenden Rezepte auf bestimmte Objektgruppen beschränkt. Manche Objekte enthalten Bestandteile, welche das Cytoplasma undurchsichtig machen, oder solche, die mit den Farbstoffen unerwünschte Nebenreaktionen geben. Für solche ist ebenfalls die Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd anzuraten, auch wenn sie osmiumfrei fixiert worden sind. Wenn dieses Aufhellungsmittel keinen Erfolg bringt, bedient man sich öfters mit Vorteil einer Behandlung der Schnitte mit der folgendermaßen zusammengesetzten Flüssigkeit:

Chlorsaures Kalium	2 g,
70proz. Alkohol	100 ccm,
konz. Salzsäure	2 Tropfen.

In dieses Aufhellungsgemisch kann man die Präparate sowohl aus Wasser als auch aus Alkohol stellen. Seine Wirkung zeigt sich schon nach 2—3 Stunden.

Ähnliche Dienste wie die vorher aufgezählten Aufhellungsmittel leistet auch Zedernholzöl; dieses gelangt zur Anwendung für Schnitte, die man vorher durch Alkohol entwässert hat; und es zeigt auch seine auf-

hellende Wirkung, wenn man es als Übertragungsmittel bei der Überführung ungeschnittener Objekte in Paraffin benutzt (siehe Kap. V).

Kapitel XII.

Das Färben.

Man kann zwei Arten von Färbungen unterscheiden, die histologische und die cytologische. Durch die erstere sollen Gewebebestandteile voneinander abgehoben werden, so z. B. kann man durch verschiedene Reagentien alle verholzten Zellwände eines Präparates rot färben, während die anderen farblos bleiben. Für uns kommen hier nur die cytologischen Färbungen in Betracht.

Mit diesen sollen zunächst Kern und Zytoplasma, weiter aber auch in diesen beiden Zellbestandteilen feinere Strukturen unterscheidbar und sichtbar gemacht werden. Hauptsächlich bedient man sich dreier Klassen von Farbstoffen.

A. Karminfarben.

Sie werden jetzt in der botanischen Mikrotechnik lange nicht mehr soviel benutzt wie früher; deshalb mag der Hinweis auf Boraxkarmin und Karmalaun nach P. Mayer (Tabelle II, S. 86) genügen.

B. Hämatoxylinfarben.

1. Die wichtigste der Färbungen dieser Art ist die Eisenhämatoxylinfärbung nach Heidenhain, eine der besten cytologischen Färbemethoden, die sich zudem vor den Färbungen mit Teerfarbstoffen durch die Einfach-

heit und Sicherheit ihrer Anwendung für den Anfänger am meisten empfiehlt.

Man benötigt für sie einer 3proz. Eisenoxydammonsulfatlösung (Eisenalaunlösung) und einer Hämatoxylinlösung. Zur Herstellung der letzteren hält man eine 10proz. Lösung von Hämatoxylin pur. in absolutem Alkohol vorrätig (dunkel aufzubewahren). Diese verdünnt man zum Gebrauch mit neun Teilen destilliertem Wasser.

Die Färbung geht in folgender Weise vor sich. Die Objektträger mit den Schnitten gelangen in der im Kapitel XI beschriebenen Weise aus dem Wasser, das zur Verdrängung des Alkohols diente, in die Eisenalaunlösung, in der sie mindestens zwei Stunden verweilen müssen. Ein längeres Verbleiben in der Lösung bringt keinen Schaden für die Schnitte mit sich. Aus dem Eisenalaun stellt man die Objektträger in ein Glas frischen Brunnenwassers, das unter der Wasserleitung 3—4mal schnell zu erneuern ist. Hat man Objektträgerpaare (s. o). eingestellt, so nimmt man sie auseinander; durch Hin- und Herschwenken der Objektträger reinigt man ihre Rückenseiten vom Eisenalaun, der die Wirksamkeit der Hämatoxylinlösung beeinträchtigen könnte, und legt sie wieder zusammen. Alle diese Manipulationen müssen in rascher Folge geschehen, damit nicht sämtlicher Eisenalaun aus den Schnitten entfernt wird. Dann werden die Objektträger bzw. Objektträgerpaare in die Hämatoxylinlösung gestellt, umgeschwenkt und mindestens zwei Stunden darin stehen gelassen. Die Objektträger länger als 24 Stunden in der Flüssigkeit zu lassen, ist nicht anzuraten (abgesehen von der später zu beschreibenden Chondriosomenfärbung). Haben die Objektträger mit den Schnitten die vorgeschriebene Zeit im Hämatoxylin verweilt, und will man ihre Weiterbehandlung aufschieben, so kann man sie ohne

Schaden in Alkohol von 96 % einige Zeit aufbewahren. Will man die Behandlung der Präparate fortführen, so bringt man sie in frisches Brunnenwasser, damit das Hämatoxylin oberflächlich abgespült wird; auch die Rückenseiten der Objektträger reinigt man in der angegebenen Weise von Hämatoxylin. Unter dem Mikroskop erscheinen die Schnitte jetzt gleichmäßig schwarz. Um einzelne Zellbestandteile vor den übrigen herauszuheben, benutzt man die Ungleichheit des Widerstandes, den sie dem Ausziehen des Farbstoffes durch Eisenalaun gegenüber leisten (Eisenoxydammon-Konzentration wie oben).

Den Prozeß, bestimmten Zellbestandteilen nach der Überfärbung der Schnitte mehr von dem Farbstoff zu entziehen als anderen und sie durch die Färbung voneinander unterscheidbar zu machen, bezeichnet man als „Differenzieren".

Das Differenzieren ist der schwierigste Handgriff bei der cytologischen Färbung, der reichliche Übung erfordert. Zum Differenzieren bedient man sich nicht desselben Gefäßes mit Eisenalaun wie zum Beizen, sondern hält ein besonderes dafür vorrätig. Man bringt die Präparate nach dem Abwaschen des Hämatoxylins in Eisenalaun, schwenkt sie darin hin und her, läßt sie noch eine kurze Weile darin stehen, nimmt sie heraus und kontrolliert das Ausziehen des Farbstoffs unter dem Mikroskop. Hierbei bemerkt man, wie in der homogenen Färbung der Zelle sich allmählich Unterschiede herausgestalten, wie sich der Kern vom Protoplasma sondert und in dem Kern die chromatischen Bestandteile von den achromatischen abheben. Während des Differenzierens stellt man den Objektträger wiederholt von neuem in Eisenalaun, schwenkt ihn darin um, damit die verbrauchte Differenzierungsflüssigkeit durch neue ersetzt wird, und kon-

trolliert dann wieder unter dem Mikroskop. Wenn man in der Zelle einen befriedigenden Gegensatz in der Färbung der Bestandteile, deren Färbung man vorzugsweise wünscht, und der übrigen erreicht sieht, wenn z. B. der Kern dunkel, das Plasma nahezu ungefärbt, in dem Kern das Chromatin gefärbt, die übrigen Teile farblos sich dem Auge zeigen, bricht man das Differenzieren ab, d. h. man stellt den Objektträger in ein Glas Leitungswasser und dieses unter die nicht zu stark strömende Leitung. Nach einer Viertelstunde ist der Eisenalaun aus den Schnitten ausgewaschen. Man gewöhne sich, die Zeit des Auswaschens möglichst genau einzuhalten, da ein kürzeres Belassen im fließenden Wasser eine mit der Zeit hervortretende Bleichung der Schnitte durch den ungenügend entfernten Eisenalaun nach sich ziehen kann, während ein längeres Verweilen im Wasser die schädliche Folge hat, daß die Bestandteile des Wassers mit dem an das Hämatoxylin gebundenen Eisen auf dem Präparat einen rostfarbenen Niederschlag bilden.

Wenn die zum Differenzieren benutzte Eisenalaunlösung von dem ausgezogenen Hämatoxylin sich dunkel gefärbt und ihre differenzierende Wirkung merklich nachgelassen hat, ist sie durch neue zu ersetzen.

Nach Beendigung des Auswaschens unter der Wasserleitung ersetzt man das Wasser in den Schnitten durch 96proz. Alkohol, indem man immer zwei Präparate aus dem Wasser herausnimmt, sie mit den Rückenflächen zusammenlegt, fächerförmig auseinanderschiebt und beiderseits mit 96proz. Alkohol übergießt (wie oben S. 54). Wer Alkohol sparen will, kann zuerst das Objektträgerpaar in einem Gefäß mit 96proz. Alkohol mehrmals hin und her schwenken und einen Augenblick darin stehen lassen, muß aber dann doch zur völligen Entfernung des Wassers aus den Schnitten die geschilderte Manipulation vornehmen,

welche dann allerdings etwas kürzer ausfallen kann. Jetzt schiebt man den Fächer wieder zusammen und schwenkt das Objektträgerpaar so lange in einem Gefäß mit Nelkenöl, bis dieses die ganze Oberfläche der Objektträger bedeckt und klar davon abläuft. Im Nelkenöl müssen die Objektträger mindestens $^1/_4$ Stunde stehen bleiben; es macht die Präparate hell und klar und die Unterschiede deutlich. Ein längeres Verweilen der Hämatoxylinpräparate in Nelkenöl bis zu zwölf Stunden ist für die Qualität derselben meistens von Vorteil. Die weitere Behandlung der Präparate wird im folgenden Kapitel erörtert werden. —

Zum Zwecke der Chondriosomenfärbung wird die geschilderte Eisenhämatoxylin-Methode in folgender Weise abgeändert: Die Präparate bleiben länger, mindestens zwei Tage, zum Beizen in der Eisenalaunlösung, werden dann nur ganz flüchtig in fließendem Wasser abgespült und gelangen darauf für wenigstens zwei Tage in die Hämatoxylinlösung. Die Schnitte sind alsdann stark überfärbt. Die Differenzierung wird in der üblichen Weise vorgenommen. Der Zeitpunkt ihrer Unterbrechung kann natürlich nicht angegeben werden, da die Chondriosomen bei der zum Differenzieren verwendbaren schwachen Vergrößerung nicht sichtbar sind. Unter Umständen kann man sich von Zeit zu Zeit nach Auflegen eines Deckglases zur Untersuchung mit der Ölimmersion über den erreichten Grad der Differenzierung genaueren Aufschluß verschaffen. Jedoch wird man bei einiger Übung auch bei schwächerer Vergrößerung aus der Färbung sichtbarer Zellbestandteile entnehmen können, wann man die Differenzierung abzubrechen hat. Im allgemeinen wird bei guter Färbung der Chondriosomen der Kern noch stark überfärbt erscheinen. (Die schwierigere Methode der Chondriosomenfär-

bung nach Benda ersehe man aus Böhm-Oppel, Taschenbuch der mikroskopischen Technik, München.)

2. Hämalaun (sauer) nach P. Mayer. 1 g Hämatein ist unter Erwärmen in 50 ccm 90proz. Alkohol zu lösen und dieser zu einer Lösung von 50 g Alaun in 1 Liter destilliertem Wassers zu gießen; alsdann sind noch 20 ccm Eisessig zuzusetzen. (Eine neuere Vorschrift von P. Mayer ist in der Tabelle II, S. 87 enthalten.) Hämalaun hält sich lange, bildet jedoch Niederschläge am Glase; man nimmt daher die Farbe mit einer Pipette mitten aus der Flasche. Die Färbezeit für Schnitte beträgt nur einige Minuten. Das Auswaschen erfolgt zunächst mit 1proz. Alaunlösung, um reine Kernfärbungen zu erzielen, dann gründlich mit destilliertem Wasser, schließlich mit Leitungswasser, in dem die Farbe blau wird. Beim Einschluß in Kanadabalsam ist Nelkenöl zu vermeiden.

C. Teerfarben.

Die für uns wichtigsten Teerfarbstoffe sind in der folgenden Übersicht enthalten.

	violett u. blau	rot	grün	gelb
Kern-farbstoffe (basisch)	Gentianaviolett (Methylviolett)	Safranin Fuchsin	Methylgrün Malachitgrün	
Plasma-farbstoffe (sauer)	Anilinblau	Säurefuchsin Eosin	Lichtgrün SF	Orange G

Die in dieser Übersicht gegebene Einteilung in Kern- und Plasmastoffe beruht darauf, daß die Bestandteile

der Zelle sich den Farbstoffen gegenüber nicht gleich verhalten. Daher kann man durch Anwendung mehrerer Farben die Kerne gegen das Plasma scharf hervortreten lassen, unter Umständen auch das Kernkörperchen im Kern, die Granula im Plasma durch abweichende Färbung deutlich machen. Bei Anwendung der Teerfarben wird man solche Mehrfachfärbungen den Färbungen mit nur einer Farbe vorziehen. Man kann sie als zeitlich getrennte Mehrfachfärbungen und als Färbungen mit Farbgemischen ausführen.

I. Zeitlich getrennte Färbungen.

1. Die am häufigsten von Botanikern gebrauchte Mehrfachfärbung ist die Flemmingsche Dreifachfärbung.

Man benötigt zur Anwendung dieser Färbemethode dreier Farbstofflösungen, die man sich nach den folgenden Rezepten herstellen kann:

a) Safranin.

Im Handel werden eine größere Anzahl Safraninsorten feilgeboten. Ich benutze in neuester Zeit die Sorte „reines Safranin" (Grübler); von diesem löst man 2 g in 100 ccm 50proz. Alkohols. Die Lösung ist nach einigen Stunden gebrauchsfertig. Man kann zur Konservierung einige Tropfen Anilinwasser zusetzen, das durch Schütteln von Anilin mit Wasser hergestellt wird. Die gleichen Dienste wie das genannte Safranin leistet „Safranin alkohollöslich", das in derselben Weise gelöst wird.

b) Gentianaviolett.

1 g Gentianaviolett wird in 100 ccm destilliertem Wasser gelöst.

c) Orange G.

Ebenfalls in Wasser zu lösen (auf 100 ccm destillierten Wassers 0,1 g Orange G.) Ich bewahre die Lösung in einer kleinen Spritzflasche auf, welche sich wegen der eigenartigen Anwendung des Orange hier besonders eignet, und vor Verwechslung des Farbstoffs mit ähnlich aussehenden vielfach üblichen Flüssigkeiten schützt. —

Die Anwendung dieser drei Lösungen ist folgende: Die Präparate werden aus Wasser in die Safraninlösung gebracht, hin und her geschwenkt und etwa 6—8 Stunden der Einwirkung des Farbstoffs ausgesetzt. Man kann ohne Schaden die Präparate auch länger in der Safraninlösung stehen lassen; hierdurch wird höchstens die Zeit der späteren Differenzierung beeinflußt. Diese wird mit Säure-Alkohol vorgenommen (100 ccm 96proz. Alkohol mit zwei Tropfen reiner Salzsäure). Vor dem Differenzieren wird der Farbstoff von den Präparaten durch Schwenken in Wasser oberflächlich abgespült. Aus dem Wasser nimmt man ein einzelnes Präparat, begießt die Schnittseite mehrmals mit 96proz. Alkohol, darauf einmal mit Säure-Alkohol, den man durch Hin- und Herbewegen des Präparates gleichmäßig über die Oberfläche verteilt, und kontrolliert unter dem Mikroskop die Differenzierung, welche meist sehr schnell vor sich geht und daher schwieriger ist, als die der Eisenhämatoxylinpräparate. Wenn in dem vor der Differenzierung durchgehends stark rot gefärbten Präparat der Kern sich deutlich vom Zytoplasma abhebt und seine Strukturen klar zu erkennen sind, bricht man das Differenzieren ab, indem man den Säure-Alkohol mit 96proz. Alkohol aus den Schnitten auswäscht. Vor dem Übergang in die Gentianaviolettlösung muß der Alkohol durch Wasser verdrängt werden. Zu diesem Zweck schwenkt man das Präparat mehrmals in einem Glas

Leitungswasser und läßt es einen Augenblick darin stehen. Dann bringt man es in die Gentianaviolettlösung, die man 2—10 Minuten einwirken läßt. Die Dauer der Einwirkung dieses Farbstoffes wie auch aller andern ist in hohem Maße von der Natur des gewählten Objekts abhängig und muß durch Ausprobieren festgestellt werden. Nach der Sättigung mit Gentianaviolett spült man den Farbstoff flüchtig in Leitungswasser ab und bedeckt die Schnittseite des Präparats mit Orange G-Lösung, die man 1 bis 5 Minuten lang über die Schnitte hin und her laufen läßt, um ein gleichmäßiges Eindringen der Farbe zu sichern. Dann differenziert man zum zweitenmal mit 96proz. Alkohol, bis dieser klar abläuft, und setzt die Differenzierung mit Nelkenöl fort, indem man das Präparat darin umschwenkt, bis es den Alkohol verdrängt hat. Jetzt setzt die mikroskopische Kontrolle des Differenzierens ein, das sein Ende findet, wenn die einzelnen Zellbestandteile sich deutlich herausheben. Hat man z. B. eine Kernteilungsfigur vor sich, so ist der geeignete Zeitpunkt zum Aufhören mit dem Differenzieren gekommen, wenn die Chromosomen rot, die Spindelfasern bläulich erscheinen und das Plasma einen gelblich-bräunlichen Ton angenommen hat. Über die Weiterbehandlung der Präparate vergl, das nächste Kapitel.

Wir haben im Bonner botanischen Institut die Erfahrung gemacht, daß diejenigen Objekte die besten Resultate mit Safraninfärbungen aufwiesen, deren Fixierung in einem Fixiergemisch mit Chromsäure erfolgt war. Wünscht man Schnitte von Objekten, deren Fixierung in einer von Chromsäure freien Flüssigkeit vorgenommen wurde, mit Safranin zu färben, so müssen sie vor dem Einstellen in diesen Farbstoff 6—24 Stunden in 1proz. Chromsäure gebeizt werden. Bevor sie in den Farbstoff gelangen, werden sie $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde in fließendem Wasser ausgewaschen.

2. Safranin-Lichtgrün.

Als Safraninlösung benutzt man für diese Doppelfärbung dieselbe wie bei der Dreifachfärbung. (Eventuell Chromsäurevorbehandlung wie oben.) Die Lichtgrünlösung wird hergestellt durch Auflösen von soviel Lichtgrün (Grübler) in 70—90 proz. Alkohol, daß die Lösung eine hellgrüne Farbe hat, worauf man zu 100 ccm derselben zwei Tropfen reine Salzsäure zusetzt. Die Präparate verweilen 6—8 Stunden in Safranin, worauf sie in Wasser abgespült werden. Die saure Lichtgrünlösung spielt bei dieser Färbemethode zugleich die Rolle des zweiten Färbungsmittels und die des Differenzierungsmittels für den ersten Farbstoff. Sie gelangt zur Anwendung wie Säurealkohol, indem man sie wie diesen auf die Schnittseite des Objektträgers gibt und über die Schnitte hin- und herlaufen läßt. Färbung und Differenzierung werden unter dem Mikroskop beobachtet, bis die Kerne rot und das Plasma grün erscheinen. Hierauf entfernt man den Säurealkohol aus den Schnitten durch Auswaschen mit 96 proz. Alkohol, schwenkt sie in Nelkenöl, bis dieses den Alkohol ersetzt hat, und behandelt weiter nach Kapitel XIII.

II. Färbungen mit Farbgemischen

1. Pianese-Färbungen.

Das Farbstoffgemisch, welches dieser Methode zugrunde liegt, gewinnen wir durch Vereinigung von

Malachitgrün	1 g,
Säure-Fuchsin	0,4 g,
Nigrosin	0,1 g,
dest. Wasser	50 ccm,
gesättigte Lösung von essigsaurem Kupfer in 96 proz. Alkohol	50 ccm.

Die Präparate kommen nach der Beseitigung des Xylols durch Alkohol für 24 Stunden in die Farbe, aus der sie zur Differenzierung einzeln herausgenommen werden. Die Differenzierung setzt ein mit dem Abwaschen der nicht an die Schnitte gebundenen Farbe durch 96 proz. Alkohol und wird weitergeführt mit Alkohol, der auf 200 ccm 1 Tropfen reine Salzsäure enthält. Sie geht außerordentlich rasch von statten und wird beendigt, wenn die mikroskopische Beobachtung den Umschlag der Farbe des Protoplasmas von grün in rot feststellen läßt. Sobald man den Beginn dieses Farbenwechsels zu erkennen glaubt, wäscht man den Säurealkohol mit 96 proz. Alkohol aus, beseitigt diesen durch Schwenken des Präparats in Nelkenöl und verfährt weiter nach Kapitel XIII.

Eine zweite, ebenfalls sehr brauchbare Pianese-Färbung, deren Ausführung, abgesehen von der Verschiedenheit der Farbgemische, mit der vorher geschilderten übereinstimmt, erfordert:

Malachitgrün	0,5 g,
Säure-Fuchsin	0,1 g,
Martiusgelb	0,01 g,
dest. Wasser	150 ccm,
96 proz. Alkohol	50 ccm.

Beide Pianesefärbungen gaben besonders gute Resultate bei Objekten, die mit Alkohol-Eisessig oder nach Juel fixiert worden sind, und eignen sich vorzüglich zur Färbung der Kernspindeln und Pollenschläuche.[1])

[1]) Ich entnahm die Vorschrift für die obenstehenden Pianese-Färbungen einer Arbeit von Pianese über Krebsgeschwulste (Beitr. z. path. Anat. u. allg. Path., 1. Suppl. 1896), fand aber die Differenzierung mit $^1/_2$ proz. Oxalsäurelösung ungeeignet für pflanzliche Objekte und ersetzte sie durch Differenzierung mit Säurealkohol.

2. Anilinblau-Eosin.

Die Anwendung dieser Färbung beschränkt sich auf die Untersuchung der Embryosäcke nach der Befruchtung und der Antheren nach der Tetradenbildung. Man löse

Eosin	3 g und
Anilinblau	0,2 g
in dest. Wasser	100 ccm.

Die Präparate kommen aus Wasser in die Farblösung, verweilen 24 Stunden darin und werden dann in Wasser abgeschwenkt. Das Wasser wird durch 96 proz. Alkohol ersetzt und die Differenzierung mit Säurealkohol (siehe oben) vorgenommen und so lange ausgeführt, bis das Cytoplasma intensiv blau, das Kerngerüst hellblau und die Nukleolen rot erscheinen. Dann werden die Präparate mit 96 proz. Alkohol und Nelkenöl behandelt (siehe oben). —

Zum Schluß sei dem Anfänger nochmals dringend empfohlen, sich genau an die hier angegebenen Vorschriften des Färbens zu halten, die angegebenen Mindestzeiten genau einzuhalten, die größte Reinlichkeit walten zu lassen und besonders dafür Sorge zu tragen, daß der erste Farbstoff sorgfältig von der Oberfläche der Objektträger und zwischen ihnen abgewaschen ist, wenn sie in die Lösung des zweiten gelangen. — Für das Differenzieren ist die natürliche Beleuchtung im diffusen Tageslicht der künstlichen vorzuziehen.

Kapitel XIII.

Das Konservieren der gefärbten Präparate.

Zur dauernden Verwahrung der Schnitte bedürfen wir eines Deckglases und eines konservierenden Mediums,

das die Eigenschaft hat, sich mit dem Nelkenöl klar zu mischen und einen anderen Brechungsindex besitzt als die bei der Untersuchung in Betracht kommenden Zellteile. Beiden Anforderungen genügt der Kanadabalsam, in Xylol gelöst. Man bewahrt ihn in besonderen Fläschchen mit aufgeschliffenem übergreifendem Deckel auf (s. Fig. 19).



Fig. 19. Fläschchen zum Aufbewahren von Canadabalsam.

Diese Konstruktion verhindert das sonst fast unvermeidliche Festkleben des Verschlusses. Festgeklebte Glasdeckel kann man leicht nach Erwärmung über der Flamme lösen. Zum Einschließen nimmt man die Präparate aus dem Nelkenöl und trennt die Objektträgerpaare. Mit dem Wischtuch nimmt man möglichst viel von dem am Glas noch adhärierenden Nelkenöl auf und reinigt auch die Unterseite des Objektträgers. Da bei dieser Prozedur die Schnitte leicht weggewischt werden können, wenn Ober- und Unterseite der Objektträger verwechselt werden, achte man darauf, daß die mit Schnitten bedeckte Seite der paarweise gestellten Objektträger sich stets außen befinden muß, und gewöhne sich daran, einzeln behandelte Objektträger stets mit der Schnittseite nach unten gewandt schräg in Nelkenöl oder in die anderen Flüssigkeiten zu stellen. Ist man jemals im Zweifel, welche Seite die Schnitte trägt, so betrachte man die Objektträger in schräg auffallendem Lichte; erscheinen die Schnitte (durch Spiegelung) doppelt, so liegen die Schnitte oben (d. h. dem Lichte zugewandt).

Um die Präparate in Balsam einzuschließen, hebt man den in ihn getauchten Glasstab heraus und läßt den Balsam ablaufen, bis nur noch einzelne Tropfen fallen. Dann

bringt man einen Tropfen auf die Mitte des Objektträgers, wo die Schnitte liegen. Die Größe dieses Tropfens richtet sich natürlich nach der der verwendeten Deckgläser. Man lernt sie schnell abschätzen; doch ist immer zu bedenken, daß die dünnste Balsamschicht die beste Beobachtung gewährleistet. Das Deckglas drückt man mit einer Pinzette oder einem ähnlichen Gegenstand fest, so daß der Balsam sich ausbreitet. Die hervortretende Flüssigkeit putzt man fort, wobei natürlich möglichst vermieden werden muß, das Deckglas oben zu verunreinigen. Luftblasen, die vielleicht beim Andrücken nicht beseitigt werden, schaden nichts; sie verschwinden von selbst. Allmählich wird der Balsam hart, da er vom Rande aus trocknet. Eine besondere Befestigung ist daher nicht nötig. Wünscht man das Präparat nach seiner Herstellung schnell zu untersuchen, so legt man es in den Wärmeschrank, wo es in einigen Stunden hart wird. Nach dem Hartwerden des Balsams säubert man das Deckglas durch Abputzen mit einem in Chloroform oder Benzin getauchten Läppchen. In derselben Weise beseitigt man das Zedernöl von den Deckgläsern und auch von den Linsen nach Betrachtung mit Immersionssystemen.

Die obenstehend gegebene Schilderung des Überganges aus Nelkenöl in Balsam genügt vollständig für solche Präparate, die man nicht länger als 1—2 Jahre aufheben will. Nach dieser Zeit kann sich unter Umständen eine bleichende Wirkung des unvollkommen entfernten Nelkenöls geltend machen, schneller bei den mit Teerfarben, langsamer bei den mit Hämatoxylin gefärbten. Wünscht man seine Präparate länger als 1—2 Jahre gut zu erhalten, so muß daher das Nelkenöl gründlicher aus den Schnitten entfernt werden. Dieses geschieht dadurch, daß man die Präparate in Xylol abschwenkt und dann erst in der beschriebenen Weise Balsam aufträgt und das Deckglas befestigt.

Statt des Nelkenöls kann man sich des Terpentinöls oder des Zedernöls bedienen, die in derselben Weise zur Anwendung gelangen. Von vielen Autoren wird in neuerer Zeit das Terpineol allen anderen Übergangsmitteln in Balsam vorgezogen. —

Wem die aufhellende Wirkung des Nelkenöls oder Terpineols durch die Langwierigkeit dieser Methode zu teuer erkauft scheint, der kann die Behandlung mit diesen beiden Stoffen weglassen, muß aber dann mit einer geringwertigeren Färbung vorlieb nehmen. Die Objektträger mit den Schnitten werden in diesem Falle nach der Färbung, soweit es nicht schon beim Differenzieren geschehen ist, mit 96proz. Alkohol abgespült, in absolutem Alkohol vollkommen entwässert und einige Minuten in Xylol gestellt, worauf das Aufkleben des Deckglases mit Kanadabalsam erfolgt. Im allgemeinen wird man seine Präparate in Balsam einschließen, weil er die größte Haltbarkeit garantiert. Doch kann es vorkommen, daß man ein weniger stark lichtbrechendes Medium wünscht, oder die Schnitte nach dem Färben nicht mehr in Alkohol bringen will. Für solche Zwecke empfiehlt sich Glyzeringelatine. Diese setzt sich zusammen aus:

Glyzerin	50 g,
reine Gelatine	7 g,
dest. Wasser	42 ccm.

Man erwärmt das Gemisch, bis die Gelatine geschmolzen ist, filtriert warm durch Glaswolle und setzt 1 g Karbolsäure zu.

Zum Gebrauch verflüssigt man die Masse und bringt mit einem Glasstab einen Tropfen davon auf das Präparat, das man vorher zweckmäßig mit Glyzerin durchtränkt, legt schnell das gereinigte Deckglas auf und drückt es an. Luftblasen sind dabei streng zu vermeiden, da sie nicht,

wie beim Kanadabalsam, von selbst verschwinden. Eventuell kann man sie mit einem Haar oder einer dünnen Nadel entfernen. Umrahmung ist nötig, darf aber erst nach einigen Wochen vorgenommen werden, weil sonst die Deckgläser leicht springen. Wie Glyzerin, so schadet auch Glyzeringelatine manchen Färbungen. Zur Umrahmung eignen sich wohl am besten Maskenlack (Grübler, Leipzig) und Krönigscher Lack:

1 Teil Wachs } in der Wärme miteinander ver-
4 Teile Kolophonium } rührt (Vorsicht).

Vorbedingung für eine gute Umrahmung ist stets sorgfältige Reinigung des Deckglasrandes. Nach dieser trägt man mit einem Pinsel den Maskenlack so auf, daß der Rand des Deckglases überall noch mit bedeckt ist. Am besten wiederholt man das Aufstreichen nach einigen Tagen, wenn die erste Lackschicht trocken geworden ist.

Den Krönigschen Lack verwendet man so, daß man ihn erwärmt, einen Spatel mit geradem Rand hineintaucht, diesen auf das Deckglas dicht an seinem Rande legt und etwas nach außen zieht. So verfährt man an allen vier Seiten. Der Krönigsche Lack wird sofort fest.

Kapitel XIV.

Umfärbung.

Unter Umständen legt die Durchmusterung eines nach einer bestimmten Methode gefärbten und konservierten Präparates den Wunsch nahe, demselben nachträglich noch eine andere Färbung zu geben. Dieser Fall kann z. B. eintreten, wenn man die Schnitte für embryologische Untersuchungen gefärbt hat und beim Durchmustern interessante

zytologische Details findet, über die man sich durch eine für zytologische Zwecke geeignetere Färbung Klarheit verschaffen möchte. Vor einer Umfärbung tut man immer gut, wertvolle Einzelheiten auch in der unvollkommenen Färbung in einer Zeichnung festzuhalten, da sie auf dem langen Wege der Umfärbung durch außerhalb der Methode liegende Schädigungen verloren gehen können.

Das Deckglas löse man von dem Präparat in der schon früher erwähnten Weise, indem man das Präparat in ein Gefäß mit Xylol stellt, mit dem Deckglas dem Boden des Gefäßes zugewandt. Eine gelinde Erwärmung des Xylols durch Aufstellen des Gefäßes auf den Wärmeschrank befördert energisch die Lösung der Balsamschicht und das Abfallen des Deckglases. Haftet das letztere auch nach der Auflösung des Balsams im Xylol durch Adhäsion am Objektträger, so führt man die Trennung durch sanftes Hin- und Herbewegen des Präparates in der Flüssigkeit herbei. Das Xylol wird (wie unter Entfernung des Paraffins beschrieben) mit Alkohol absolutus und 96proz. Alkohol, der Alkohol durch Abspülen der Präparate in Leitungswasser aus den Schnitten ausgewaschen.

Die Entfärbung der Schnitte ist natürlich je nach der Art der angewandten Farbstoffe verschieden. Eisenhämatoxylin zieht man aus den Schnitten mit Eisenalaun aus, der wie beim Differenzieren als 3proz. wässerige Lösung zur Anwendung gelangt. Die Präparate bleiben solange darin stehen, bis die mikroskopische Beobachtung die vollständige Beseitigung der schwarzen Farbe aus den Schnitten ergibt. Den Eisenalaun wäscht man eine Viertelstunde lang in fließendem Wasser aus und beseitigt eine dann etwa noch vorhandene bräunliche oder gelbliche Farbtönung durch Einstellen der Präparate in 3proz. Wasserstoffsuperoxyd bis zur vollständigen Bleichung

Dann spült man die Objektträger mit den Schnitten in Wasser ab und behandelt die Präparate weiter nach der gewünschten Färbemethode, genau wie solche, die nie gefärbt waren.

Mit Teerfarben gefärbte Schnitte bleicht man in 1 proz. Chromsäure, deren Entfernung in fließendem Wasser erfolgt. Die Schnitte werden so lange ausgewaschen, bis man sich durch mikroskopische Kontrolle von dem vollständigen Verschwinden der durch die Chromsäure bedingten Gelbfärbung überzeugt hat.

Für zu stark gefärbte Hämatoxylinpräparate, denen man eine bessere Differenzierung angedeihen lassen möchte, vereinfacht sich das Verfahren insofern, als man nach dem Ablösen des Deckglases und dem Auswaschen des Xylols durch Alkohol die Differenzierung mit Eisenalaun zur Vollendung bringen kann und dann weiterhin verfährt, wie nach der ersten Differenzierung. Zu schwach gefärbte Hämatoxylinpräparate, denen man eine stärkere Färbung mit demselben Farbstoff zu verleihen wünscht, braucht man nicht so sorgfältig zu entfärben wie beim Wechsel der Färbung; die Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd kann wegfallen. Die aus dem Eisenalaun genommenen Präparate werden weiterbehandelt wie die im gleichen Stadium befindlichen, die noch nicht gefärbt waren.

Kapitel XV.

Praktische Anweisungen für den Anfänger.

1. Günstige Objekte zum Studium der Kernteilung.

Der Anfänger bedient sich zum Lernen natürlich mit Vorteil möglichst leicht zu behandelnder, demonstrativer

Objekte. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über eine Reihe von Objekten, die zur Einführung in das Studium der somatisch-diploiden und der haploiden Kernteilungen besonders geeignet sind.

Bezeichnung	Chromosomenzahl		Bemerkungen
	haploid	diploid	
Galtonia	8	16	6 große, 2 kleine Chromosomen
Allium Cepa . . .	8	16	Wurzelspitzen leicht im Hyazinthenglas zu gewinnen
Lilium Martagon .	12	24	
Trillium	8		
Aloë	7		4 lange, 3 kurze Chromosomen
Hyacinthus . . .	8	16	
Alstroemeria . . .	8		
Canna indica . . .	8		
Rumex acetosa . .	8		
Spinacia oleracea .	6	12	
Melandryum album .	12	24	
„ rubrum	12	24	1 auffällig großes Chromosom bzw. Chromosomenpaar
Podophyllum peltatum	8	16	
Vicia Faba . . .	6	12	Wurzelspitzengewinnung (s. S. 75)
Pisum sativum . .	7	14	Wurzelspitzengewinnung (s. S. 75)

2. Gewinnung und Verarbeitung von Wurzelspitzen.

Die botanische Cytologie ist gegenüber der zoologischen dadurch im großen Vorteil, daß man bei den Pflanzen sich leicht embryonale, in lebhafter Teilung befindliche Gewebe verschaffen kann. Zum Studium der somatischen Kernteilung wählt man am besten Längs- und Querschnitte von Wurzelvegetationspunkten, weil die Wurzelspitzen leicht zu beschaffen und nicht von Blattorganen bedeckt

sind, und weil bei ihnen das Wachstum am schärfsten lokalisiert ist. Hat man von der zur Untersuchung vorliegenden Pflanze Samen zur Verfügung, so bringt man diesen zum Keimen und fixiert die Keimwurzeln. Der Anfänger bedient sich am besten der Keimwurzeln von Vicia Faba oder Pisum sativum. Man läßt die Samen einige Stunden in warmem Wasser quellen, setzt sie dann in Abständen, die später ein bequemes Herausnehmen der Keimlinge gestatten, in feuchte Sägespäne[1]) und stellt die Töpfe, wenn möglich, in ein Gewächshaus. In zirka drei Tagen haben die Samen kräftige Wurzeln entwickelt, deren Fixierung auf S. 6 nachzulesen ist. Kleinere Samen bringt man auf angefeuchtetem Fließpapier in Petrischalen zur Keimung. Von manchen Pflanzenspezies, insbesondere vielen Liliaceen, ist keimfähiger Samen schlecht zu erhalten. Handelt es sich um Gewächse, die keinen zu großen Raum einnehmen, dann hilft man sich folgendermaßen: Man gräbt die Pflanze nebst den Wurzeln aus der Erde, schneidet die Wurzeln etwas zurück und verpflanzt das Gewächs in einen Topf (Gemisch von Flußsand und Gartenerde zu gleichen Teilen.) Wenn man sich überzeugt hat, daß neue Wurzeln in größerer Zahl gebildet sind, nimmt man die Pflanze mit dem Topfballen heraus und entnimmt ihr die jungen Wurzelspitzen. Meist genügt zur Fixierung das Material, das sich an der Außenseite des Topfballens findet. Man achte darauf, daß die von den Wurzelhaaren festgehaltenen Sandkörnchen, die sich später loslösen, nicht mit ins Paraffin gelangen. Ihre Beseitigung geschieht am besten im Chloroform, in dem die

---

[1]) Sägespäne von Quercus haben wegen ihres Gehalts an Gerbstoff ungünstigen Einfluß auf die Entwicklung der Wurzeln.

Wurzelspitzen flottieren, während die Körnchen sofort zu Boden sinken.

Von Bäumen und Sträuchern kann man oft Wurzelspitzen durch Einstecken abgeschnittener Zweige in Flußsand gewinnen. Wenn Wurzeltriebe vorhanden sind, gräbt man diese mit einem Stück der Wurzel aus und zwingt sie in der beschriebenen Weise zur Bildung von Adventivwurzeln.

Beim späteren Schneiden des fixierten Materials beschränke man sich auf die Verwendung der Wurzelenden (6—7 mm vom Vegetationspunkt an gerechnet), da innerhalb dieser Zone die meisten Teilungen anzutreffen sind. Zwecks Erlangung möglichst vieler Kernplatten in Polansicht, wie man sie zum Feststellen der diploiden Chromosomenzahl einer Pflanze braucht, zerlegt man die Wurzelspitzen in Querschnitte. Die meisten Spindelansichten gewinnt man Längsschnittbildern ab.

Da die Zahl der Chromosomen, die in den Reifeteilungen der Gonotokonten auftreten, durchweg die Hälfte von der in vegetativen Kernen ist, so kann ihre Feststellung zur Kontrolle der Zählung an vegetativen Kernen dienen. Man wird dazu vor allem die späteren Stadien der ersten Reifeteilung (von der Diakinese ab) und das Kernplattenstadium der zweiten Reifeteilung studieren. Bei Antheren ist der Unterschied in der Lagerung der Spindeln nicht so scharf ausgeprägt als bei Wurzeln. Doch schneidet man auch hier, um die Kernteilungsfiguren in größter Mannigfaltigkeit der Ansicht zu treffen, zweckmäßig teils längs, teils quer.

3. Bemerkungen für embryologische Arbeiten.

Schwieriger als für das Studium der cytologischen Erscheinungen gestalten sich für die Beobachtung der embryo-

logischen Vorgänge, wie Befruchtung usw., die Beschaffung des Materials und seine mikroskopisch-technische Behandlungsweise. Vorteilhafte Objekte sind folgende:

Wir wählen Lilium Martagon als Objekt, das uns die Teilung des generativen Kerns im Pollenschlauch gut zeigt. Am Morgen eines regenfreien Tages nimmt man mit der Pinzette eine stäubende Anthere aus einer Blüte und streicht den Pollenstaub auf die Narbe frisch geöffneter Blüten, deren Wiedererkennung man sich durch eine Marke sichert. Nach 5—8 Stunden schneidet man die bestäubten Narben nebst einem größeren Stück des Griffels heraus und fixiert sie. Zur Färbung der in Längsschnitte zerlegten Objekte verwendet man am besten Eisenhämatoxylin, da dieses den Pollenschläuchen nur eine schwache Färbung verleiht, so daß sie die Vorgänge in ihrem Inneren gut erkennen lassen. Eine vorzügliche Färbung der Pollenschläuche selbst erreicht man mit der Pianese-Färbung (S. 65 ff.).

Der Eintritt des Pollenschlauches in den Embryosack und die weiteren Vorgänge der Befruchtung, die sich dort abspielen, sind an kultivierten Liliaceen wegen ihrer mangelhaften Samenentwicklung meist nicht zu beobachten. Wir verwenden hierfür an ihrer Stelle zwei diözische Pflanzen, Melandryum album oder rubrum. Wir bestäuben die Narben und fixieren die aus den weiblichen Blüten herausgenommenen Fruchtknoten 38—42 Stunden später. Am besten besorgt man bei Melandryum die Bestäubung abends zwischen 6 und 7 Uhr, so daß die Fixierung während des Tages vorgenommen werden kann. Nach dem Fixieren und Auswaschen bringt man die Objekte in 85proz. Alkohol und präpariert, nachdem sie einen Tag darin gelegen haben, die Samenanlagen aus den geöffneten Fruchtknoten mit einer Nadel heraus. Wenn man die Objekte aus dem Näpfchen, in dem sie im Wärmeschrank

der Durchtränkung mit Paraffin ausgesetzt waren, in das Einbetteschälchen schüttet, nehmen die meisten beim Untersinken von selbst die richtige Lage an, d. h. sie stellen sich mit der Längsachse parallel zum Boden des Gefäßes ein. Man legt je 4—5 nebeneinander, eine Manipulation, bei der sich die Einbettetrommel besonders bewähren wird. Infolge dieser Vereinigung mehrerer Objekte in einem Paraffinprisma kann man in kurzer Zeit viele von ihnen in Serienschnitte zerlegen, so daß die Wahrscheinlichkeit, eine größere Anzahl medianer Schnitte zu erhalten, beträchtlich steigt. Ein richtiges Bild von der Lage des Eiapparates, des Zentralkerns und der Antipoden werden dem Beschauer nur diejenigen Schnitte vermitteln können, welche gleichzeitig Funiculus, Knospenkern, Integumente und Mikropyle erkennen lassen.

Ohne daß man sich der Mühe des Bestäubens unterziehen müßte, kann man den Befruchtungsvorgang, wie überhaupt die Reihe der Stadien, welche der Embryosack bis zur Ausbildung des Embryo durchmacht, an Myosurus minimus studieren. Unter Umständen zeigt eine einzige Ähre sämtliche Etappen der Entwicklung, da die einzelnen Blüten in Bezug auf den Reifegrad von der Spitze der Ähre bis zu ihrer Basis eine aufsteigende Reihe bilden. Auch hat das Objekt vor den Melandryen den Vorzug der leichteren Orientierung in Paraffin, da man nur die Ähren parallel zur Längsachse zu schneiden braucht, um eine ganze Anzahl medianer Schnitte zu erhalten. Zum selben Zweck wie Myosurus läßt sich auch Plantago verwenden.

Wenn das Studium der Pollenschläuche auf ihrem Wege von der Narbe durch den Griffel zum Embryosack nicht gelingt, kann man sich durch Kultur des Pollens in künstlichen Nährböden über dessen Keimfähigkeit Aufschluß verschaffen. Als geeignetes Nährsubstrat benutzen wir

2proz. wässerige Agar-Agar- oder 5—10proz. Gelatinelösung, die etwas Rohrzucker enthält. Man gießt das Medium in Petrischalen und läßt es dort erstarren. Über die Menge des Rohrzuckers lassen sich keine allgemeinen Angaben machen, da für die verschiedenen Pflanzen die günstigste Konzentration in weiten Grenzen schwankt. Während z. B. nach Nawaschin die Pollenkörner der gemeinen Birke ausschließlich in destilliertem Wasser Schläuche treiben, keimen die Pollenkörner von Lilium Martagon am besten bei Zusatz von 15 %, die von Colchicum autumnale sogar am besten bei einem solchen von 40—50 % Rohrzucker. Man bereitet sich also zunächst Nährböden von verschiedenem Zuckergehalt, etwa solche von 5, 10, 15 und 20 %. Erfolgt bei diesen Konzentrationen keine Keimung, so variiert man den Zuckergehalt nach oben und unten, bis der gewünschte Erfolg eintritt. Die Übertragung des Pollens auf den Nährboden nimmt man vor durch Bestreichen mit reifen Antheren oder mit einem Pinsel, den man an stäubenden Antheren mit Blütenstaub beladen hat.

Nach dem Austreiben der Schläuche fixiert man entweder die ganze Schicht durch vorsichtiges Übergießen mit der Fixierungsflüssigkeit, die am besten (zum Härten) Chromsäure oder Kaliumbichromat enthält (Flemming, Regaud usw.), und zerlegt sie nach der Fixierung in einzelne Stücke, oder aber man sucht unter dem Mikroskop die Stellen heraus, die die meisten Pollenschläuche enthalten, schneidet diese mit einem Skalpell heraus und fixiert sie. Die Weiterbehandlung der fixierten Nährbodenstücke mit den Objekten erfolgt in der gewöhnlichen Weise. Nur ist anzuraten, den Aufenthalt in fließendem Wasser beim Auswaschen nicht zu lange auszudehnen.

4. Beobachtung bei künstlichem Licht.

Wenngleich es nicht der Zweck dieses Buches ist, Bau und Handhabung des Mikroskops und seiner Nebenapparate zu erörtern, möchte es doch angebracht sein, am Schlusse dieses Abschnittes einen von jedermann leicht zu beschaffenden Apparat zur Beobachtung bei künstlicher Beleuchtung kurz zu beschreiben.

Als Lichtquelle benutzt man am besten eine Gas- oder Spiritus-Glühlichtlampe. Ihr Licht wird durch eine Glaskugel von circa 15 cm Durchmesser auf den Mikroskopspiegel geworfen. Eine regelmäßig geblasene Schusterkugel läßt sich zu diesem Zweck verwerten; besser ist es, eine ähnliche Kugel etwa von der Firma Zeiß-Jena zu beziehen. Sie wird in einem festmontierten Rahmen aufgehängt, der an der Vorderseite ein Brett mit kreisrunder Öffnung trägt, der die Kugel anliegt. Lichtquelle und Mikroskop werden etwa 15—20 cm vor der Glaskugel aufgestellt. Um ein angenehmes Licht zu erhalten, füllt man die Kugel mit einer dünnen Kupferoxyd-Ammoniak-Lösung. Man stellt diese folgendermaßen her: In einem Liter destillierten Wassers löst man 1 g Cuprum nitricum und setzt Ammoniak zu, bis tief-violette Färbung eingetreten ist. Von dieser Lösung gibt man etwa 10 ccm in die Glaskugel und füllt mit der nötigen Menge destillierten Wassers, dem 20—30 ccm Ammoniak zugesetzt worden sind, auf.

Die Vorrichtung gibt ein so gutes, gleichmäßiges Licht zur Beobachtung, daß man sie nicht nur bei eintretender Dunkelheit, sondern gerade bei schwierigen Untersuchungen auch am hellen Tage mit Erfolg anwendet. Zudem hat sie vor anderen Mikroskopierlampen den Vorzug der Billigkeit und der leichten Beschaffbarkeit voraus.

Anhang.

Tabellarische Übersicht der wichtigsten Fixier- und Färbemittel. Instrumentarium des Arbeitstisches.

Tabelle I. **Fixierung.**

Name	Zusammensetzung	Bemerkungen
Alkohol-Eisessig (Carnoy)	a) abs. Alkohol 3 Teile dest. Wasser 1 Teil b) abs. Alkohol 6 Teile Chloroform 3 Teile Eisessig 1 Teil	Dringt sehr gut ein. Auswaschen mit abs. Alkohol. (Vgl. S. 15.) Anwendung wie a. Besonders für Farne empfohlen.
Alkohol-Zinkchlorid-Eisessig (Juel)	80proz. Alkohol 1200 ccm $ZnCl_2$ 24 g Eisessig 24 ccm	Wie bei Alkohol-Eisessig. (Vgl. S. 15.)
Chromessigsäure	dest. Wasser 100 ccm Chromsäure 1 g Eisessig $^1/_2$ g	Besonders für Algen. Einwirkung 24 Stunden. Auswaschen mit Wasser.
Chrom-Osmium-Essigsäure (Flemmings Gemisch)	1. Bonner Mischung Chromsäure 1 proz. 180 ccm Osmiumsäure 2 proz. 25 ccm Eisessig 12 ccm dest. Wasser 210 ccm 2. Starkes Gemisch Chromsäure 1 proz. 75 ccm Osmiumsäure 2 proz. 20 ccm Eisessig 5 ccm	Einwirkung tagelang. Möglichst kleine Objekte nehmen. Wenig Fixiermittel erforderlich. Auswaschen mit Wasser. (Vgl. im übrigen S. 12f.)

Tabelle I. **Fixierung.** (Fortsetzung.)

Name	Zusammensetzung	Bemerkungen
Chrom-Osmium-Essigsäure (Flemmingsches Gemisch)	3. Bendas Gemisch. $^1/_2$ proz. Chromsäure mit Zusatz von 1 Proz. Kochsalz 15 ccm 2 proz. Osmiumsäure 3—4 ccm Eisessig 3—4 Tropfen	Für Chondriosomenfixierung. Anwendung 6 Tage. (Vgl. S. 16.)
Chrom-Platin-Essigsäure (Juel)	2 proz. Chromsäure 25 ccm 10 proz. Platinchloridlösung 2,5 g Eisessig 1 ccm dest. Wasser 75 ccm	Anwendung wie bei dem Flemmingschen Gemisch. Besonders gut für junges Gewebe. Vgl. S. 14.
Eisenchlorid-Chromessigsäure (Guignard)	Chromsäure 5 g offic. $FeCl_3$-Lösung 5 g Eisessig 20 g dest. Wasser 1000 ccm	Auswaschen mit Wasser.
Kaliumbichromat-Eisessig (Tellyesniczky)	Kaliumbichromat 3 g Eisessig 5 ccm dest. Wasser 100 ccm	Jedesmal kurz vor dem Gebrauch zu bereiten. Auswaschen mit Wasser.
Kaliumbichromat-Formol (Regaud)	3 proz. Kaliumbichromatlös. 4 Teile käufl. Formol 1 Teil	Vor jedem Gebrauch frisch zu bereiten. Für Chondriosomenstudien. Einwirkung 4 Tage. Nachbehandlung mit 3 proz. Kaliumbichromat mehrere Tage lang. Auswaschen mit Wasser. (Vgl. S. 16.)

Tabelle I. **Fixierung.** (Fortsetzung.)

Name	Zusammensetzung	Bemerkungen
Pikrinessigsäure (Boveri)	Pikrinsäure 1 g dest. Wasser 100 ccm Eisessig 1 ccm	Zum Auswaschen sogleich Alkohol von so hoher Konzentration, wie ihn das Objekt verträgt, nehmen. Zur Entfernung der gelben Färbung dem Alkohol einige Tropfen konz. wäss. Lithiumkarbonatlösung zusetzen.
Pikrin-Osmium-Essigsäure (v. Rath)	gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 100 ccm 2 proz. Osmiumsäurelös. 6 ccm Eisessig 2 ccm	(Vgl. S. 14f.)
Pikrin-Schwefelsäure (Němec)	gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 200 ccm Eisessig $^1/_2$ ccm Schwefelsäure $^1/_{10}$ ccm	Für Wurzelspitzen empfohlen.
Platinchlorid-Osmium-Essigsäure (Hermann)	1 proz. Platinchloridlös. 15 ccm 2 proz. Osmiumsäure 2-4 ccm Eisessig 1 ccm dest. Wasser 18 ccm	Anwendung wie Flemmings Gemisch. (Vgl. S. 13f.)
Sublimat-Eisessig (Kaiser)	Sublimat 10 g Eisessig 3 g dest. Wasser 300 ccm	Beim Auswaschen ist dem 70 proz. Alkohol Jodjodkalium zuzusetzen. (Vgl. S. 16.)
Sublimat-Kochsalz (Heidenhain)	Sublimat 7 g Kochsalz $^3/_4$ g Wasser 100 ccm	Wie beim vorigen Fixiermittel. (Vgl. S. 16.)

Tabelle II. **Färbung.**

A. Karminfärbungen.

Farbe	Zusammensetzung	Bemerkungen
Karmalaun (nach Mayer)	Karminsäure 1 g Alaun 10 g dest. Wasser 200 ccm	Durch Erwärmen lösen, dann filtrieren und der Lösung $^1/_5$ g Salizylsäure zusetzen. Zur Erzielung reiner Kernfärbung mit 5 proz. Alaunlösung auswaschen, dann mit dest. Wasser. Färbung sehr haltbar. Zusatz von 20 ccm Holzessig hält die Farbe mehrere Jahre klar.
Boraxkarmin, alkoholisch (nach Grenacher)	1. Karmin 2—3 g 2. Borax 4 g 3. Wasser 100 ccm 4. 70proz. Alkohol 100 ccm	1 und 2 durch Kochen in 3 lösen, dann 4 zusetzen, einige Wochen stehen lassen und filtrieren. — Nach dem Färben Auswaschen mit saurem Alkohol (100 ccm Alkohol, 3 Tropfen Salzsäure). Färbung sehr haltbar.

B. Hämatoxylin-Färbungen.

Farbe	Zusammensetzung	Bemerkungen
Saures Hämalaun (nach Mayer)	1. Hämatein 1 g 2. 90proz. Alkohol 50 g 3. Alaun 50 g 4. dest. Wasser 1000 ccm 5. Eisessig 20 ccm	1 in 2 (durch Erwärmen) lösen, ebenso 3 in 4, die erste Lösung zur zweiten schütten und filtrieren, schließlich 5 zusetzen. Sofort zum Gebrauch fertig. (Anwendung siehe Seite 61.)

Tabelle II. **Färbung.** (Fortsetzung.)

Farbe	Zusammensetzung	Bemerkungen
Saures Hämalaun (nach Mayer), neue Vorschrift	1. Hämatoxylin 1 g 2. dest. Wasser 1000 ccm 3. Natriumjodat 0,2 g 4. Alaun 50 g 5. Chlorhydrat 50 g 6. Zitronensäure 1 g	1 in 2 lösen, 3 und 4 zusetzen und unter Umschütteln bei Zimmertemperatur lösen. Dann 5 und 6 zusetzen. Hält sich noch länger als Hämalaun der alten Vorschrift. Anwendung ebenso.
Eisenhämatoxylin (nach Heidenhain)	a) 1 proz. wässerige Hämatoxylinlösung b) 3 proz. Eisenalaunlösung	Herstellung von a) siehe Seite 57. 1. Beizung der Objekte mit b. 2. Färbung mit a. 3. Differenzieren mit b. (Vgl. im übrigen S. 57 ff.)
C. Teerfarben.		
Anilinblau, wasserlöslich	Dünne wässerige Lösung	Plasmafarbstoff. Doppelfärbung mit Eosin siehe Seite 67.
Eosin	Schwache wässerige (oder alkoholische) Lösung	Plasmafarbstoff. Doppelfärbung mit Anilinblau siehe Seite 67. Sehr gebräuchlich zur Nachfärbung nach Hämalaun (nur einige Minuten).

Tabelle II. **Färbung.** (Fortsetzung.)

Farbe	Zusammensetzung	Bemerkungen
Fuchsin	a) Wässer. od. alkoholische Lösung	Kernfarbstoff. Kann wie Safranin verwandt werden.
	b) Karbolfuchsin nach Ziehl: Fuchsin 1 g Wasser 100 ccm Alkohol 10 ccm Karbolsäure 5 ccm	Zur Kernfärbung anwendbar. (Sonst zur Sporenfärbung von Bakterien gebraucht.)
Gentianaviolett	1 proz. wässerige Lösung	Kernfarbstoff. Färbung in Balsam sehr haltbar. Differenzieren mit Säurealkohol wie bei Safranin, oder mit Orange G und Alkohol (siehe Seite 62 f.). Nachdifferenzieren mit Nelkenöl, das die Farbe langsam auszieht, ist möglich. — Zur Nachfärbung nach Eisenhämatoxylin benutzt, um Pollenschläuche deutlich sichtbar zu machen. Anwendung bei der Flemmingschen Färbung siehe Seite 64.
Lichtgrün SF	Schwache alkoholische Lösung	Guter Plasmafarbstoff. Einwirkung nur kurze Zeit. Färbung leider oft nicht haltbar.
Malachitgrün	Dünne wässerige Lösung	Kernfarbstoff (Nukleolenfärbung). Anwendung bei der Pianese-Färbung siehe Seite 65 f.

Tabelle II. **Färbung.** (Fortsetzung.)

Farbe	Zusammensetzung	Bemerkungen
Methylenblau		Wird (außer zu Bakterienfärbungen und zu Lebendfärbungen) nicht viel in der botanischen Technik benutzt, kann aber zu schneller orientierender Färbung dienen.
Methylgrün	Methylgrün $^1/_2$ g Wasser 100 ccm Eisessig 2 ccm	Kernfarbstoff. Anwendung zur Orientierungsfärbung an unfixierten Objekten s. S. 5. Farbe nicht haltbar, daher bei Dauerpräparaten nicht zu verwenden.
Methylviolett 5 B	Wässerige Lösung	Sehr guter Kernfarbstoff. Anwendung wie Gentianaviolett.
Orange G	Schwache wässerige Lösung	Plasmafarbstoff. Anwendung bei der Flemmingschen Färbung siehe Seite 63.
Säurefuchsin	Schwache wässerige Lösung	Guter Plasmafarbstoff. Schwache Färbungen kann man durch Ansäuern des Waschwassers verstärken, zu starke durch Auswaschen in Leitungswasser abschwächen. Anwendung bei der Pianese-Färbung S. 65 f.
Safranin	100 ccm 50 proz. Alkohol 2 g Safranin	Meistbenutzter Kernfarbstoff. Anwendung siehe Seite 62 ff.

Instrumentarium des Arbeitstisches.

Mikroskop: Vor der Anschaffung eines Mikroskopes sind die Preislisten und Kataloge unserer leistungsfähigsten Firmen — Leitz-Wetzlar, Seibert-Wetzlar, Winkel-Göttingen, Zeiß-Jena u. a.), von außerdeutschen etwa Bausch & Lomb-Rochester U. S., Agentur Frankfurt a. Main, Schillerstr. 30) und Reichert-Wien VIII (Bennogasse) — einzusehen. Je nach den Mitteln, die zur Verfügung stehen, und den Aufgaben, welche mit Hilfe des Instrumentes gelöst werden sollen, wird man bei seiner Wahl innerhalb weiter Grenzen Spielraum haben. Der Zytologe nimmt am besten ein größeres Stativ, das die Anbringung eines Revolvers, eines Beleuchtungsapparates und sonstiger Nebenapparate gestattet. Es kommen also hauptsächlich in Betracht die Stative A bis F und I bis IIa von Leitz, 1—5 C von Seibert, 1—1c, 2a—C und 4 von Winkel, I, III und IV von Zeiß. Die Zusammenstellung der Objektive und Okulare ist dem Besteller überlassen. Zu empfehlen wären z. B. folgende Kombinationen:

Leitz-Objektive 3,7; homog. Imm. $^1/_{12}$
Okulare I, III, V, Vergr. 51—1260;
Seibert-Objektive 3, $5^1/_2$; homog. Imm. $^1/_{12}$
Okulare 0, 2, 3; Vergr. 75—1220;
Winkel-Objektive 3, 7; homog. Imm. $^1/_{12}$
Okulare 1, 3; Vergr. 60—1100;
Zeiß-Objektive A, E; homog. Imm. $^1/_{12}$
Okulare 1, 3, 5; Vergr. 44—1320.

Wer die Kosten tragen kann, wähle statt der angegebenen achromatischen Objekte Apochromate oder Fluoritsysteme, die dann mit Kompensationsokularen zu benutzen sind. Auch die

achromatischen starken Trockensysteme und Immersionen lassen sich vorteilhaft mit Kompensationsokularen verbinden, wodurch die Vergrößerung wesentlich erhöht werden kann. — Auf weitere Einzelheiten einzugehen ist hier nicht der Ort.

Für manche Zwecke ist es empfehlenswert, ein Präpariermikroskop zur Verfügung zu haben. Es kann von den oben genannten Mikroskop-Firmen in verschiedenen Preislagen bezogen werden.

Mikrotom. Das auf Seite 40 ff. beschriebene Schlittenmikrotom der Firma Jung kostet, je nach Größe und Ausstattung mit Nebenapparaten, 168—389 Mk. Gute Mikrotome verschiedener Konstruktion liefern außer Jung-Heidelberg auch Bausch & Lomb, Leitz, Reichert, u. a. Passende Messer-Streichriemen usw. sind bei denselben Firmen zu haben.

Paraffinofen. Bezugsquellen: Altmann-Berlin, Jung, Leitz, Reichert u. Rohrbeck-Berlin. Der Preis eines einfachen Modells, wie es auf Seite 26 f. beschrieben ist, beträgt etwa 45 bis 80 Mk., mit Thermoregulator usw. 20 Mk. mehr. Ein einfacher Paraffinofen kann im Notfall auch von einem geschickten Klempner angefertigt werden.

Einbettetrommel. Über Preis und Bezugsquelle siehe oben S. 30.

Zentrifuge. Die angegebene zweiarmige Zentrifuge ist z. B. bei Jung oder Leitz zum Preise von 13—16 Mk. zu beziehen.

Objektträger. Sie sind bei allen Firmen, die Mikroskope liefern, und in vorzüglicher Qualität außerdem z. B. bei Dr. Grübler & Co.-Leipzig, Vogel-Gießen (Westanlage 32) zu haben. Man benutze englisches Format (76 × 26 mm).

Preis bei Vogel-Gießen: ungeschliffen grünlich 100 Stück 1,— Mk., ungeschliffen weiß (Salinglas) 100 Stück 1,50 Mk. Für an den Kanten geschliffene Objektträger ist der Preis für 100 Stück etwa 1,— Mk. höher.

Deckgläser werden von denselben Firmen geliefert. Empfehlenswert sind die Formate: 18 × 18 mm, 24 × 32 mm, 45 × 25 mm. Preise für 100 Stück bei Vogel-Gießen 1,80 Mk, 4,— Mk., 5,— Mk.

Mikroskopische Bestecke (Skalpell, Nadeln, Pinzetten, Rasiermesser, Scheren, Pinsel usw.) liefern die Instrumentenhandlungen in verschiedenen Austattungen und zu dementsprechend verschiedenen Preisen. Natürlich kann man die Instrumente auch einzeln kaufen.

Wasserstrahlluftpumpe. Bezugsquellen siehe oben unter Paraffinofen. Preis von 1,50 Mk. aufwärts.

Wichtigste Chemikalien, zu beziehen bei Kahlbaum-Berlin, Merck-Darmstadt oder Grübler & Co.-Leipzig.

In der folgenden Aufzählung sind, wo nicht anders bemerkt, die augenblicklichen Preise von Grübler angegeben.

Alkohol absol. 1 Liter kostet im Apothekerhandel etwa 2,50 Mk.
Bergamottöl, 100 g 5,50 Mk.
Canadabalsam, mit Xylol 100 g 1,30 Mk.
Cedernholzöl, eingedickt 100 g 1,80 Mk.
Cedernholzöl, zum Aufhellen 100 g 0,50 Mk.
Chloroform, 100 g 0,40 Mk.
Chromsäure, krist. 100 g 0,50 Mk.
Eisenchlorid, in der Apotheke käuflich.
Eisenoxydammon, schwefels. 100 g 0,50 Mk.
Eisessig, 100 g 0,20 Mk.
Formalin, 100 g 0,30 Mk.
Gelatine, 100 g 0,70 Mk.
Glyzerin, säurefrei 100 g 0,40 Mk.
Glyzeringelatine nach Kaiser, 100 g 1 Mk.
Jodjodkalium, 100 g 0,50 Mk.
Kaliumbichromat, 100 g 0,40 Mk.
Maskenlack Nr. 3, 100 g 1,20 Mk.
Nelkenöl, 100 g 1,50 Mk.
Osmiumsäure in Röhrchen, à $^1/_2$ g etwa 2,50 Mk.
Paraffin, Schmelzpunkt 50—52^0 C, 1 kg 2,— Mk.
Pikrinsäurelösung, 100 g 0,10 Mk.
Platinchlorid, 10proz. Lösung, 10 g 1,80 Mk.
Salpetersäure }
Salzsäure } in jeder Apotheke zu haben.
Schwefelsäure }

Sublimat, 100 g 1,— Mk.
Terpentinöl, 100 g 0,20 Mk.
Thymol, krist., 10 g 0,40 Mk.
Wasserstoffsuperoxyd, 100 g 0,20 Mk.
Xylol, 100 g 0,20 Mk.
Zinkchlorid im Apothekerhandel erhältlich.

Farben. Aus der Tabelle II sind die wichtigsten zu ersehen. Man beziehe sie bei Grübler & Co.-Leipzig.

Präparatenmappen sind zu haben z. B. bei Jung-Heidelberg, Vogel-Gießen, Schröter-Leipzig-Connewitz usw.

Sach-Register.